

〈平成17年度〉

酸化LDL受容体の発現制御に着目した動脈硬化の新しい 予防法の確立と沖縄産食材に含まれる活性成分の発掘

村 上 明

(京都大学農学研究科食品生物科学専攻)

1. 研究背景と本研究の目的

2004年の日本の死亡数を死因順位別にみると、第1位はがん（32万315人、31.1%）、第2位は心疾患（15万9490人、15.5%）、第3位は脳血管疾患（12万9009人、12.5%）となっている¹⁾。1981年以降、がんは死因の第1位であり、一貫して増加し続けていることから広く注目されているが、ともに動脈硬化が原因である心疾患と脳血管疾患による死亡数を合計すると、がんのそれに匹敵することは特筆に値する。

動脈硬化は、高脂血症、高血圧、喫煙、肥満、年齢など種々の要因が複雑に絡み合って発症・進展するものであり、動脈が肥厚、あるいは硬化して弾性を失った状態をいう。これにより、動脈内腔が狭窄し、虚血を起こすと脳梗塞、心筋梗塞、大動脈瘤などの疾病を引き起こす。

いくつもの大規模な疫学研究の結果から、血中の低比重リポタンパク（low-density lipoprotein, LDL）コレステロール濃度が粥状動脈硬化を基盤とする疾患の主要な危険因子であることが知られている。しかし、最近の研究で、抗酸化物質が動脈硬化の進展を抑制すること²⁾や、動脈硬化病変部位には変性したLDLが沈着していることが確認されていることから、LDLそのものが動脈硬化発症の原因ではなく、修飾を受けたLDLが重要であることが明らかとなってきた。そして現在では、Steinbergらが提起した、LDLの酸化を引き金とする発症機序が広く受け入れられている³⁾。

酸化LDLは、内皮細胞の接着分子であるICAM-1（intercellular adhesion molecule-1）、VCAM-1（vascular cell adhesion molecule-1）、セレクトリン（selectin）などの発現を促し、これらに血液中の単球が結合する⁴⁾。さらに、酸化LDLは内皮細胞からの単球走化性因子（monocyte chemoattractant protein-1, MCP-1）およびマクロファージコロニー刺激因子（macrophage-colony stimulating factor, M-CSF）の発現を誘導し、内膜への単球の侵入および分化が促進される⁵⁾。

このマクロファージへの分化過程で発現してくるマーカーの一群が、スカベンジャー受容体（scavenger receptor, SR）である⁶⁾。SRは酸化LDLを認識して、エンドサイトーシスにより細胞内へ取り込み、結果としてコレステロールエステルを蓄積した泡沫細胞（foam cell）となる。泡沫細胞が増加・集積することで脂肪線条（fatty streak）と呼ばれる脂質の沈着を伴った初期病変が形成される。

泡沫細胞の増加とともに、酸化LDLおよび泡沫細胞が産生するサイトカインによって中膜平滑筋細胞の遊走も起こる。それに引き続き、壊死した泡沫細胞から放出された脂質を中心部分（core）として、血管平滑筋細胞やマトリックスタンパク質からなる繊維性被膜が覆ったプラーク（atheroma plaque）が形成される。プラークが、マトリックスメタロプロテイナーゼ（matrix metalloproteinase, MMP）により脆弱化・破綻をきたすと、血栓形成を介した血管の閉塞を引き起

こすことになる⁷⁾。

2000年に発表された都道府県別生命表によると、沖縄県の平均寿命は男性77.6歳（26位）、女性86.0歳（1位）であった⁸⁾。有数の長寿国である日本の中でも特に沖縄は長寿県として知られ、その理由は心疾患の死亡率の低さにあると言われている。沖縄県の死因別死亡率は、心疾患が男性42位、女性47位、脳血管疾患が男女ともに47位であり、動脈硬化による死亡率が非常に低い。

沖縄県は単に野菜の摂取量が多いだけでなく、本土にはない独特の野菜を伝統的に摂取していることが大きな特徴である。最近の健康ブームで、秋ウコンやシークワサーなどが本土にも浸透してきているが、亜熱帯地域に属する沖縄県には本土には見られない植物食材がまだ数多く存在しており、それらの生理機能性が報告されている。

本研究室において、沖縄産植物食材138種の抽出物についてフリーラジカル産生抑制活性試験を行い、本土でも食される通常種と沖縄独特の種との活性を比較したところ、70%以上の O_2^- およびNO産生抑制率を示した食材の割合は沖縄独特の種の方が高いことが判明した⁹⁾。したがって、沖縄独特の食素材は生理活性が高く、動脈硬化予防に有望な活性成分の探索源として期待できると考えられる。

以上から、本研究では動脈効果発症予防の新しい方策として、沖縄独特の食材に着目し、SR発現抑制成分を検索することを目的とした。

2. 本土と沖縄の野菜の活性比較

沖縄産野菜16種と、消費量の多い本土の野菜9種のホモジネートを調製し、小腸吸収モデルであるCaco-2細胞単層のapical側培地に25% (v/v) 添加し、24時間培養した（図1）。培養後のbasolateral側培地100%中でTHP-1細胞を30分前培養した後、TPA（30 nM）で刺激し、24時間

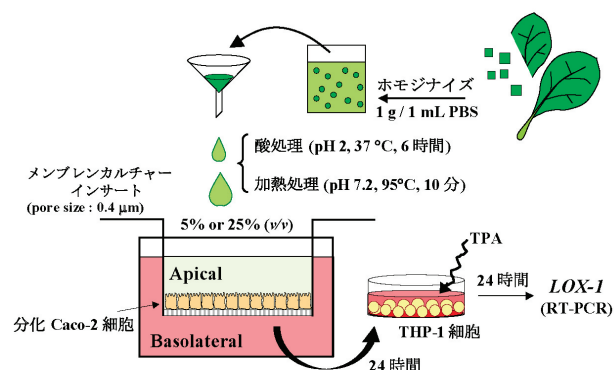


図1 本試験系の概要

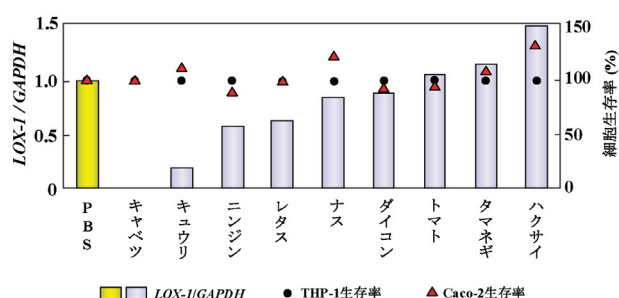


図2 本土産野菜の試験結果

培養後のLOX-1 mRNA発現レベルをRT-PCR法により解析した。まず、本土の野菜では、キャベツとキュウリに強い抑制活性が見られた（図2）。キャベツには、発がん予防効果などが知られているイソチオシアネート (isothiocyanate, ITC) が多く含まれていることから、ITCによる効果が想定できる。しかし、同じくアブラナ科のダイコンやハクサイには抑制活性がなかったことから、ITCと同様にキャベツの生理活性成分として知られているビタミンC、ビタミンK (vitamin K)、およびビタミンU (vitamin U) による作用かもしれない。

沖縄産野菜の添加試験では、ヨモギ、ハナショウガ春ウコン、秋ウコンおよびアキノワスレグサに非常に強い抑制活性が見られた（図3）。しかしながら、秋ウコンはCaco-2に対する毒性が見られ、それとは対照的に、ハナショウガはCaco-2の生存率が2倍以上に上昇した。Caco-2の生存率はMTT assayにより評価しているため、ハナショウ

表1 スクリーニングに用いた沖縄産野菜

一般名	科	学名
ヨモギ	キク	<i>Artemisia indica</i> Willd
ハナショウガ	ショウガ	<i>Zingiber zerumbet</i> Smith
春ウコン	ショウガ	<i>Curcuma aromatica</i> Salisbury
秋ウコン	ショウガ	<i>Curcuma longa</i> L.
アキノワスレグサ	アカザ	<i>Chenopodium</i> L
チョウメイソウ	セリ	<i>Peucedanum japonicum</i> Thunb
シ馬拉ッキョウ	ユリ	<i>Allium bakeri</i>
モズク	モズク	<i>Nemacystis decipiens</i> Kuckuck
アーサ	ヒトエグサ	<i>Monostroma nitidum</i> Wittrock
シークワサー	ミカン	<i>Citrus deressa</i>
スイゼンジナ	キク	<i>Gynura bicolor</i>
ニガウリ	ウリ	<i>Momordica charantia</i> L.
ヘチマ	ウリ	<i>Luffa cylindrica</i> Roem.
ニガナ	キク	<i>Ixeris dentate</i> Nakai.
ベニイモ	ヒルガオ	<i>Ipomoea batatas</i>
サトウキビ	イネ	<i>Saccharum officinarum</i> L.

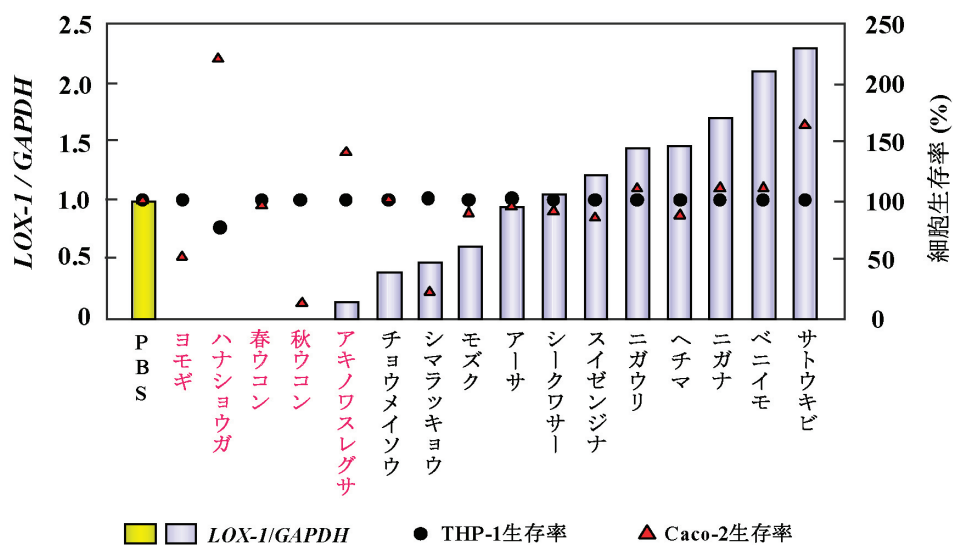


図3 沖縄産野菜ホモジネート添加Caco-2 basolateral側培地のLOX-1 mRNA発現抑制活性

ウガに関しては、細菌の混入によってCaco-2が産生した O_2^- などによってホルマザンへの還元反応が起こり、吸光度が上昇したと推察された。従って、本試料の細胞毒性をより正確に測定するためには、乳酸脱水素酵素 (LDH) 活性の測定法の方が適しているかもしれない。

上述した5種以外にも、チョウメイソウとシ馬拉ッキョウにも50%以上の抑制が見られた。本土の野菜では、50%以上の抑制活性が見られたのは9種のうち2種のみだったが、沖縄産野菜は16種のうち7種だった。このことから、沖縄産野菜が動脈硬化予防成分の探索源として有望であるこ

とが示唆される。

一方、ベニイモとサトウキビにはLOX-1 mRNA発現増強作用が見られた。この理由としては、試料中に含まれるグルコースの存在が挙げられる。これまでに、グルコースによってLOX-1とSR-Aの発現が増強することが報告されているが、そのメカニズムとして、プロテインキナーゼC (protein kinase C, PKC) 依存性のnicotinamide adenine dinucleotide (NADPH) oxidaseの活性化による活性酸素種 (reactive oxygen species, ROS) の産生と、それに引き続くactivator protein-1 (AP-1) とNF κ Bの活性化作用が提唱されている^{10, 11)}。ベ

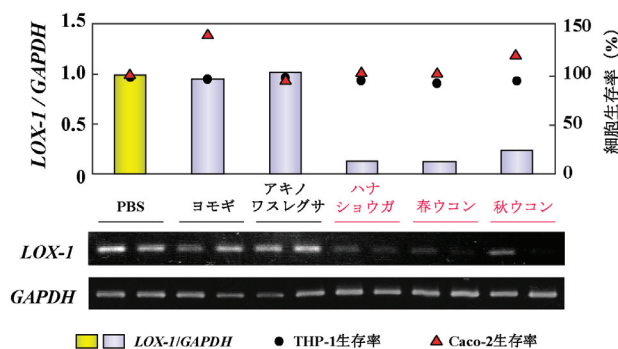


図4 5% (v/v) 添加における再評価 (n=2)

ニイモとサトウキビはグルコース含量が多いこと、そしてPBSを使用したホモジネートをアッセイに用いているので、basolateral側培地中にグルコースが高濃度で含まれている可能性も高いことから、上記した可能性は妥当であると考えられる。

次に、添加濃度25%による試験で高活性を示した5種について、添加濃度を5%に下げて再評価を行なった(図4)。その結果、ヨモギとアキノフスレグサは5%では抑制活性が見られなかったが、ハナショウガ、春ウコンおよび秋ウコンは5%でも強い活性が見られた。

これまで、秋ウコンは抗動脈硬化作用を持つことがこれまでに見出されており、高脂肪食を投与したウサギに秋ウコンの水アルコール抽出物を1.6 mg/kgの用量で投与し、30日間飼育したところ、血中の脂質過酸化レベルと、胸部および腹部大動脈の脂肪線条が減少したことなどが報告されている¹²⁾。しかし、ハナショウガについては、動脈硬化に対する研究例はないことから、ハナショウガに着目し、活性成分の究明、およびSRの発現に対する効果を検討した。

3. ハナショウガ成分zerumboneのSR mRNA発現抑制作用

まず、ろ紙濾過後に酸・加熱処理をしたホモジネート1 mLからEtOAc抽出物が1.6 mg得られた。そして、HPLCによって分析した結果、 t_R 6.86に非常に顕著なピークが検出され、それがゼルンボ

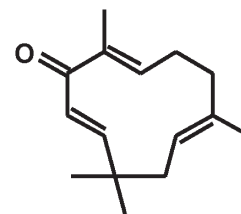
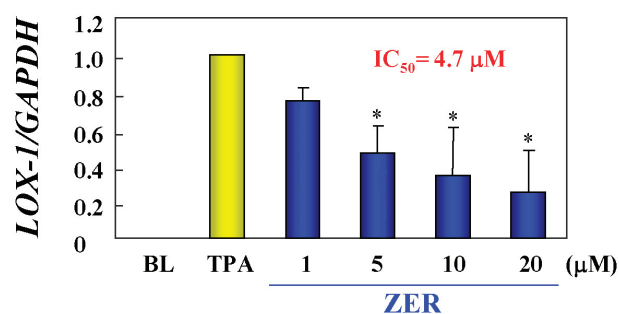


図5 Zerumboneの構造



* $P < 0.05$ (vs TPA), n=3

図6 ZERのLOX-1 mRNA発現抑制活性

ン(zerumbone, ZER)のピークと一致した。ZERはこれまでに当研究室において、発がん予防効果¹³⁾や O_2^- 産生抑制活性¹⁴⁾などが報告されているセスキテルペンである。

次にTHP-1細胞にZERを1~20 μ Mの濃度で添加し、30分間前培養後、TPAで刺激した。そして、24時間培養後のLOX-1 mRNAの発現レベルを評価したところ、ZERは濃度依存的にLOX-1 mRNAの発現を抑制し、 IC_{50} 値は4.7 μ Mであった(図6)。

4. SRと接着分子の発現に対するZERの効果

上で述べたように、動脈硬化の発症および進展にはLOX-1以外のSRも深く関与している。また、単球が血管壁に接近する段階で発現してくる接着分子も動脈硬化を悪化させる要因の1つである。動脈硬化予防効果が報告されている α -トコフェロールも、単球の接着分子の発現を抑制することが知られている¹⁵⁾。

そこで、LOX-1以外のSRと接着分子の発現に対するZERの効果を検討した。その結果、ZERは

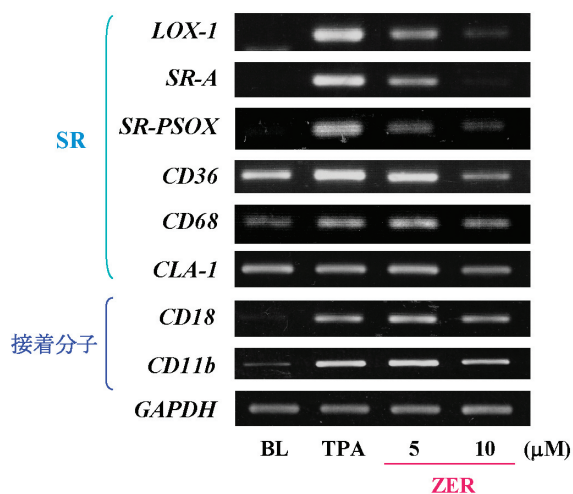


図7 SRと接着分子の発現に対する効果

SR-AとSR-PSOXの発現は10 μ Mでほぼ完全に抑え、CD36については、5 μ Mでは効果が見られなかったが、10 μ Mで85%抑制した(図7)。しかしながら、同じくSRであるCD68とCLA-1、ならびに接着分子のCD18とCD11bに対しては、10 μ Mにおいても10~20%程度しか抑制活性を示さなかった。したがって、ZERは分化過程で発現してくる全てのマーカーに対して抑制活性を示すのではなく、特定のSRの発現を選択的に抑制している可能性が示唆された。

5. DiI-acLDLの取り込みに対するZERの作用

ZERがLOX-1を始めとするいくつかのSRのmRNA発現を抑制することが判明したので、次にマクロファージによる変性LDLの取り込みを阻害するか否かを検討した。THP-1細胞にZER(10 μ M)を添加し、30分間前培養し、TPA(30 nM)で刺激して48時間培養した後、DiI-acLDL(10 μ g/mL)を加え、さらに4時間培養した時の取り込みを比較した。

その結果、THP-1細胞はTPA刺激なしではDiI-acLDLをほとんど取り込まないが、TPAで48時間刺激すると53%の細胞にDiI-acLDLの取り込みが観察された(図8)。それに対し、ZERで前処理した場合は、取り込みが13%にまで抑制された。したがって、ZERはSRの発現抑制作用を通して、変性LDLの取り込み阻止作用を有することが明らかとなり、このメカニズムによってマクロファージの泡沫化、さらには動脈硬化を抑制できる可能性が強く示唆された。

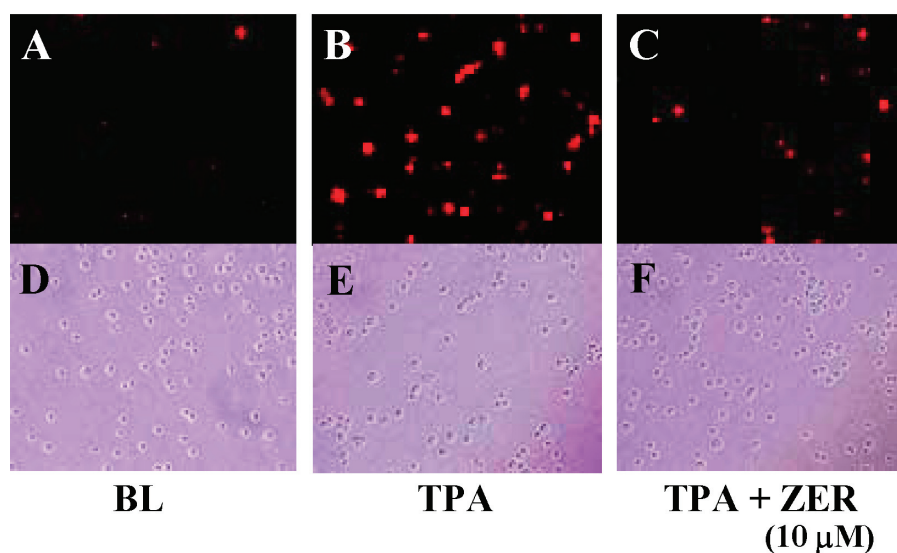


図8 DiI-acLDLの取り込みに対するZERの作用

6. おわりに

本研究は、食品素材やその成分に関してS R抑制作用を評価した最初の例の1つである。実際に、ゼルンボンがin vivoでもS Rの発現を抑制し、その機構によって動脈硬化が阻止できるか否かについての評価は今後の課題として残されているが、新しいアプローチの提示という点では意義のある研究例だと自己評価している。今後さらに、その方面での研究を進展させると共に長寿をもたらしている伝統的な食材の機能性に関する網羅的な研究にも挑戦してみたい。

謝 辞

本研究を行うにあたり（財）浦上食品・食文化振興財団には多大なご援助を賜りました。また、ご指導頂いた大東 肇教授（京都大学名誉教授）と研究協力頂いた金子友紀さんと江口愛さんに深く御礼申し上げます。

文 献

- 1) 厚生労働省統計情報部「平成16年度 死因別死亡数の割合」
- 2) Kita T, *et al.*, Probucol prevents the progression of atherosclerosis in Watanabe heritable hyperlipidemic rabbit, an animal model for familial hypercholesterolemia. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, **84**, 5928-31, 1987.
- 3) Steinberg D, *et al.*, Beyond cholesterol. Modifications of low-density lipoprotein that increase its atherogenicity. *N Engl J Med.*, **320**, 915-24, 1989.
- 4) Kume N, *et al.*, Lysophosphatidylcholine, a component of atherogenic lipoproteins, induces mononuclear leukocyte adhesion molecules in cultured human and rabbit arterial endothelial cells. *J Clin Invest.*, **90**, 1138-44, 1992.
- 5) Glass C, *et al.*, Atherosclerosis. the road ahead. *Cell.*, **104**, 503-16, 2001.
- 6) Greaves D, *et al.*, Thematic review series: the immune system and atherogenesis. Recent insights into the biology

of macrophage scavenger receptors. *J Lipid Res.*, **46**, 11-20, 2005.

- 7) Galis Z, *et al.*, Increased expression of matrix metalloproteinases and matrix degrading activity in vulnerable regions of human atherosclerotic plaques. *J Clin Invest.*, **94**, 2493-503, 1994.
- 8) 厚生労働省統計情報部「平成12年度 都道府県別生命表」
- 9) Murakami A, *et al.*, Suppressive Effects of Okinawan Food Items on Free Radical Generation from Stimulated Leukocytes and Identification of Some Active Constituents: Implications for the Prevention of Inflammation-associated Carcinogenesis. *Asian Pac J Cancer Prev.*, **6**, 437-48, 2005.
- 10) Nishimura S, *et al.*, Oxidized low-density lipoprotein (ox-LDL) binding to lectin-like ox-LDL receptor-1 (LOX-1) in cultured bovine articular chondrocytes increases production of intracellular reactive oxygen species (ROS) resulting in the activation of NF-kappaB. *Osteoarthritis Cartilage.*, **12**, 568-76, 2004.
- 11) Fukuhara T, *et al.*, Expression of class A scavenger receptor is enhanced by high glucose in vitro and under diabetic conditions in vivo: one mechanism for an increased rate of atherosclerosis in diabetes. *J Biol Chem.*, **280**, 3355-64, 2004.
- 12) Quiles J.L, *et al.*, Curcuma longa extract supplementation reduces oxidative stress and attenuates aortic fatty streak development in rabbits. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.*, **22**, 1225-31, 2002.
- 13) Murakami A, *et al.*, Zerumbone, a sesquiterpene in subtropical ginger, suppresses skin tumor initiation and promotion stages in ICR mice. *Int J Cancer.*, **110**, 481-90, 2004.
- 14) Murakami A, *et al.*, Zerumbone, a Southeast Asian ginger sesquiterpene, markedly suppresses free radical generation, proinflammatory protein production, and cancer cell proliferation accompanied by apoptosis: the alpha,beta-unsaturated carbonyl group is a prerequisite. *Carcinogenesis.*, **23**, 795-802, 2002.
- 15) Terasawa Y, *et al.*, Alpha-tocopherol protects against monocyte Mac-1 (CD11b/CD18) expression and Mac-1-dependent adhesion to endothelial cells induced by oxidized low-density lipoprotein. *Biofactors.*, **11**, 221-33, 2000.

Establishment of novel means for atherosclerosis prevention directing the expression regulation of oxidized LDL and a search for active compounds in Okinawan food items

Akira Murakami

(Division of Food Science and Biotechnology, Graduate School of Agriculture, Kyoto University)

Unregulated uptake of oxidized low-density lipoproteins (ox-LDL) via macrophage scavenger receptors (SRs), such as lectin-like ox-LDL receptor-1 (LOX-1), is a key event in atherosclerosis. In the present study, we used differentiated Caco-2 cells as a model of the human small intestine to evaluate the suppressive effects of 16 traditional food items selected from Okinawa on 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA)-induced LOX-1 mRNA expression in THP-1 human monocyte-like cells. Three Zingiberaceae plants, *Curcuma aromatica* Salisbury, *Curcuma longa* L., and *Zingiber zerumbet* Smith, markedly suppressed that expression. When added to the apical sides of Caco-2 monolayers, zerumbone, a sesquiterpene from *Z. zerumbet* Smith, was found to permeate into the basolateral medium as an intact structure in a time-dependent manner. alpha-Humulene, a structural analog of zerumbone lacking the alpha,beta-unsaturated carbonyl group, did not suppress LOX-1 mRNA expression, indicating that its electrophilic moiety might play pivotal roles in its activities. Further, zerumbone attenuated the expression of SR-A, SR-PSOX, and CD36, but not that of CD68 or CLA-1, leading to a blockade of DiI-acLDL uptake, while it also inhibited the transcriptional activities of activator protein-1 and nuclear factor-kappaB. Together, our results indicate that zerumbone is a potential phytochemical for regulating atherosclerosis with reasonable action mechanisms.