

ヒト肝がん由来培養細胞を用いたコレステロール合成抑制物質の 新規探索

(申請代表者)	大和 進	新潟薬科大学薬学部薬品分析化学研究室	教授
(共同研究者)	中川沙織	新潟薬科大学薬学部薬品分析化学研究室	助教

1. 背景・目的

脂質異常症の治療薬には、スタチン系薬物、フィブラート系薬剤、陰イオン交換樹脂、エゼチミブなどがあり、これら薬物を服用することにより、コレステロール値をコントロールすることができる。なかでも、第一選択薬であるスタチン系薬物は、コレステロール合成経路の上流にあり、コレステロール合成の律速酵素であるHMG-CoA (3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A) 還元酵素を阻害することによりコレステロール合成を抑制する。これらの薬物のコレステロール低下作用は強力であり、臨床でも幅広く用いられている。脂質異常症は運動不足や肥満などが原因となり引き起こされる疾患であるため、日常生活での生活習慣を改善し、また、食生活を改善することによっても予防可能な疾患である。そのため、生体に対する作用が緩やかな食品成分で、コレステロール低下作用を持つ物質、特にこれまでに報告の少ないコレステロール合成経路の下流に位置する合成酵素に作用する物質の探索は、これまで使用されてきた上流を阻害する医薬品との併用で、相乗効果も狙えると考えられる。

ヒト体内におけるコレステロール生合成は主に肝臓で行われており、まずアセチルCoAからHMG-CoAやスクアレンを経てラノステロールが合成され、その後デスモステロールあるいはラノステロールを介して合成される。したがって、コレステロール合成経路の前駆物質であるスクアレンやデスモステロール、ラノステロールおよび7-デヒドロコレステロールの網羅的解析によって、コレステロール合成経路のいずれかに抑制作用をもつ物質の機能評価を行うことができる。

フラバノン類に属するヘスペレチン、ナリンゲニンおよびエリオジクチオールは配糖体およびそのアグリコンは、柑橘類の果皮に多く含まれており、これまでに抗がん作用 や血中脂質低下作用などが報告されている。柑橘類は日常生活の中で手軽に摂取することが可能であり、また、既存の医薬品よりも生体に及ぼす作用が緩やかと考えられることから、脂質異常症の予防効果が期待される。本研究では、生体に対して多くの生理機能が報告されているポリフェノールに焦点を当て、なかでも食物由来の身近な成分であるフラバノン配糖体のナリンゲニン、ヘスペリジンおよびフラバノンアグリコンのヘスペレチン、ナリンゲニンおよびエリオジクチオール、また、多様な機能を示すクルクミンのコレステロール合成経路に及ぼす影響について検討した。

2. 実験方法

2-1. 試薬

コレステロール合成前駆体の標準品のうち、スクアレンは和光純薬工業社製を用い、デスモステロール (純度 >95%)、ラノステロール (純度 ≥98%)、7-デヒドロコレステロール (純度 ≥98%) およびコレステロール (純度 ≥99%) はシグマ-アルドリッチ社製を用いた。内部標準物質 (I.S.) である5 α -コレスタン (純度 ≥97%) は和光純薬工業社製を用いた。ポリフェノールの標準物質のうち、ヘスペレチン (純度 ≥98%) はフナコシ社製、ナリンゲニン (純度 ≥95%) およびエリオジクチオール (純度 ≥95%) はシグマ-アルドリッチ社製、ダイゼイン (純度 ≥98%) およびゲニステイン (純度 ≥99%) はコスモバイオ社製を用いた。ナリンゲニン、ヘスペリジンおよびクルクミンは、いずれも和漢医薬学総合研究所より恵与された。

2-2. 機器

コレステロール合成前駆体およびコレステロールの定量に用いたガスクロマトグラフィー-質量分析計 (GC-

MS) は島津社製のGCMS-QP5050A {質量分析：電子衝撃イオン化 (EI) 検出器}、オートサンプラーは島津社製のAOC-20s、オートインジェクターは島津社製のAOC-20i、キャピラリーカラムはJ&W社製のDB-5MS (30 m×0.25 mm、膜厚0.25 μm) を用いた。前処理に使用した窒素発生器はGL Sciences社製の小型窒素発生器ニトロミニNM910、窒素吹付装置はEYELA社製のDry Thermo Bath MG-2100、攪拌器はThermo Fisher Scientific社製のMulti-Tube Vortexerおよび遠心機は、久保田社製のテーブルトップ冷却遠心機2800を用いた。細胞培養においては、三洋社製のCO₂インキュベーターMCO-5ACおよびクリーンベンチMCV-B131Fを、細胞数測定にはオリンパス社製の倒立型顕微鏡CKを用いた。

2-3. 細胞培養法

ヒト肝がん由来のHepG2細胞を100 mmディッシュ中に1×10⁶ cells /10 mLとなるように播種し、10% FBSを含むDMEM培地 (Penicillin-Streptomycin含有) を用いて10時間前培養後、10% LPDS含有DMEM培地に交換することで、コレステロール合成を亢進させる細胞培養系を作製した。この細胞培養系にヘスペリジン、ナリンゲニン、ヘスペレチン、ナリンゲニン、エリオジクチオールあるいはクルクミンのDMSO溶液 をそれぞれ添加し、36時間培養後、細胞サンプルを得た。また、コレステロールに対する作用についてはHepG2細胞を100 mmディッシュ中に1×10⁶ cells /10 mLとなるように播種し、72時間培養し細胞サンプルを得た。細胞はtrypsin-EDTA処理を行ってサンプルを回収し、倒立型顕微鏡を用いて細胞数を計測した。

2-4. 細胞内コレステロール合成前駆体およびコレステロールのGC-MS定量法

細胞サンプル (2×10⁶個) の入った50 mL遠沈管にメタノール2 mLおよびジルコニアビーズ0.9 gを加え、室温で5分間振とうし、細胞を破砕した。そこに、内標準物質 (Internal Standard, I.S.) の5- α -コレスタン250 ngを溶解したメタノール3 mLおよび10 mol/L水酸化カリウムの2 mLを加え、室温で1時間攪拌し、けん化を行った。その後、50%リン酸を加えて中和し、水5 mLおよびn-ヘキサン10 mLを加え、室温で3分間振とうして溶媒抽出を行い、3000 rpmで5分間遠心分離し、n-ヘキサン層を別の遠沈管に移し替えた。この溶媒抽出操作を2回繰り返した後、n-ヘキサン層のみが入った遠沈管をさらに3000 rpmで5分間遠心分離し、上清のみを別の遠沈管に移すことで混入した水相を取り除いた。窒素気流下で溶媒を乾固させた後、Tri-Sil HTP Reagentを70 μL加え、60°C、30分、窒素雰囲気下でトリメチルシリル誘導体化を行った。最後に、窒素気流下で溶媒を乾固させ、コレステロール合成前駆体の定量ではn-ヘキサン100 μLで再溶解し、コレステロールの定量ではこれをさらに200倍希釈し、5 α -コレスタン、コレステロール合成前駆体およびコレステロールをGC-MSで定量した。

3. 結果・考察

3-1. コレステロール前駆体およびコレステロールのGC-MSによる定量性

スクアレン、5 α -コレスタン (I.S.)、コレステロール、デスモステロール、7-デヒドロコレステロールおよびラソステロールの保持時間は、それぞれ11.0 min、11.7 min、14.5 min、15.6 min、15.6 minおよび15.9 minに検出され、これらは良好に分離された。さらに、これらのコレステロール合成前駆体およびコレステロールの検量線は、0.3～10 μg/mLの範囲において定量可能で、相関係数は0.997～0.999と、いずれも良好な直線性が得られた。HepG2細胞サンプルに対する添加回収率は99～103%の範囲内と、いずれも良好であった。

3-2. コレステロール合成経路に対するポリフェノールの効果

この定量法を用いて、フラバノン配糖体のナリンゲニン、ヘスペリジンおよびフラバノンアグリコンのナリンゲニン、ヘスペレチンおよびエリオジクチオールによるコレステロール合成前駆体およびコレステロールに対する作用を検討した。また、イソフラボン類のダイゼインおよびゲニステインも同様に作用評価を行った。その結果、フラバノン配糖体のナリンゲニンおよびヘスペリジン、あるいはクルクミンの細胞培養系への添加においては、コレステロール合成前駆体のスクアレン量、デスモステロール量、ラソステロール量および7-デヒドロコレステロール量のいずれもが、無添加のコントロール値と比べて変化がなく、また、コレステロール値も同様に、変化を認めなかった。一方、フラバノンアグリコンのナリンゲニン、ヘスペレチンおよびエリオジクチオールの添加においては、コントロ

ール値と比較して、コレステロール合成前駆体のラソステロール量および7-デヒドロコレステロール量を増加し、デスモステロール量を微減した (Fig. 1)。また、イソフラボン類のダイゼインおよびゲニステインはデスモステロールを増加させた。これらの結果より、フラバノン配糖体のナリンギンおよびヘスペリジンが培養細胞内に取り込まれないが、フラバノンアグリコンは細胞内に取り込まれ、7-デヒドロコレステロールからコレステロールおよび7-デヒドロデスモステロールからデスモステロールの過程を抑制していると考えられた。その過程に共通して働いている酵素は、sterol Δ^7 - reductase (DHCR7) であり、この酵素に対する阻害作用が強く推察された。

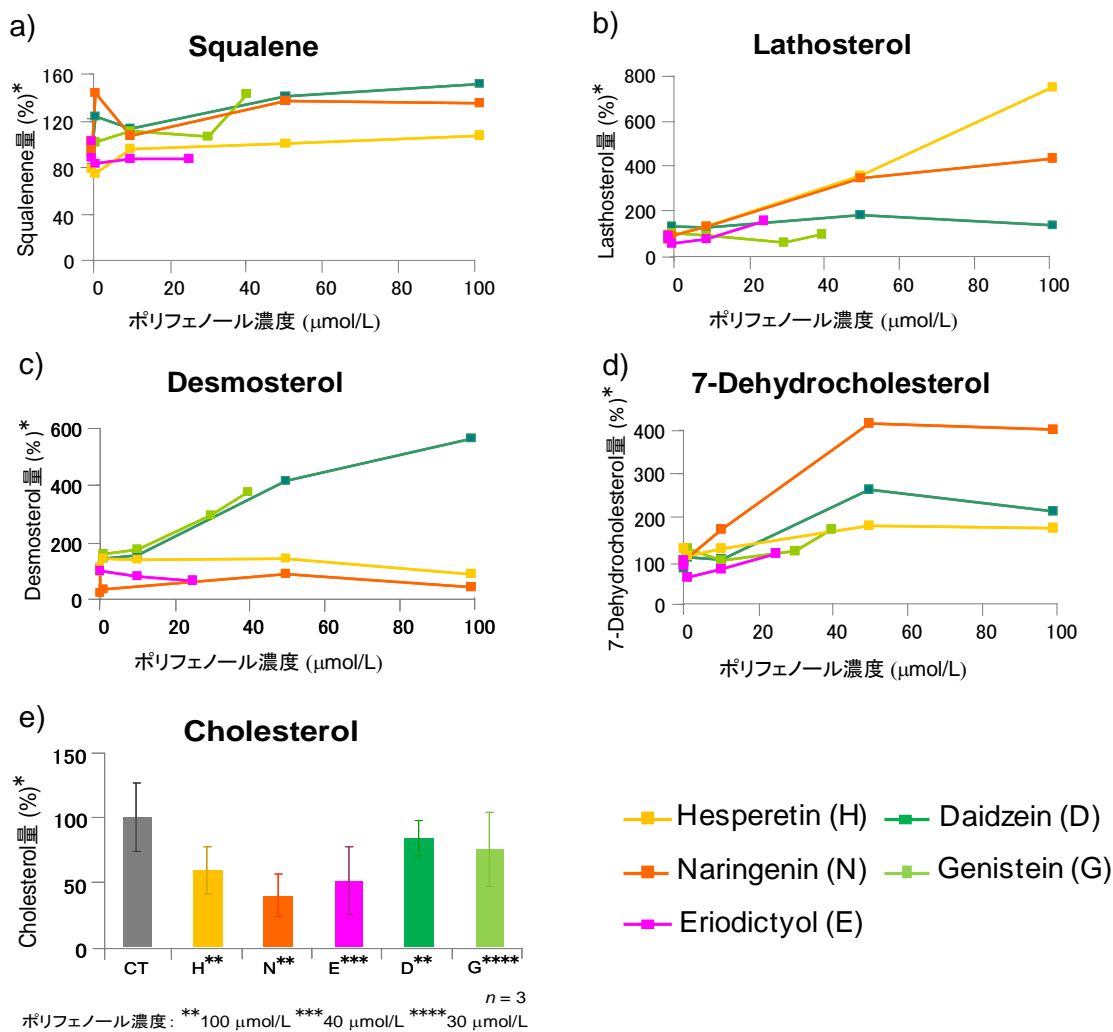


Fig. 1 コレステロール合成前駆体およびコレステロールへのポリフェノールの影響

a) スクアレン, b) ラソステロール, c) デスモステロール, d) 7-デヒドロコレステロール, e) コレステロール

* コントロール (CT) を100%としてそれぞれ求めた。

4. 結論

ポリフェノール、特に、柑橘類フラバノンアグリコンのコレステロール合成経路に及ぼす影響をHepG2細胞の培養細胞系を用いて検討したところ、コレステロール合成経路の下流に位置するDHCR7の抑制作用を見出した (Fig. 2)。これら柑橘類由来のフラバノン類は容易に摂取でき、脂質異常症患者におけるコレステロール値のコントロールに有用と考えられた。その作用部位はコレステロール合成経路の下流にあり、フラバノン類の新たな代謝系阻害作用として、新しい作用機序の脂質代謝異常症治療薬として、あるいは既存の治療薬との併用による相乗効果が期待できる。

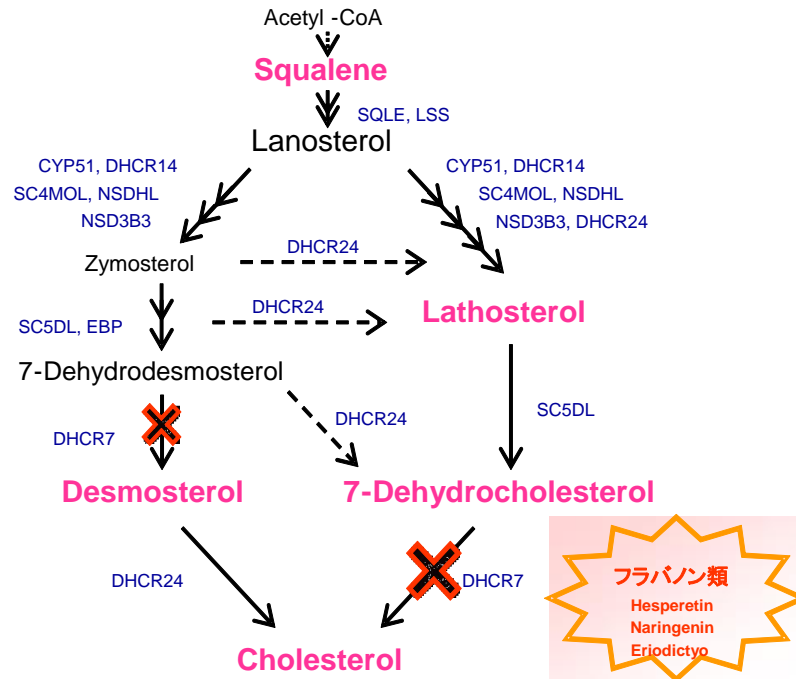


Fig. 2 予想されるコレステロール合成抑制部位

HMG-CoA, 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A; SQLE, squalene epoxidase; LSS, lanosterol synthase; CYP51, Lanosterol 14 α -demethylase; DHCR14, Sterol Δ 14-reductase; SC4MOL, Sterol C4 methyl-oxidase; HSD3B3, 3 β -ketoreductase; NSDHL, 3 β -hydroxy Δ 5-steroid dehydrogenase; EBP, sterol 8, 7-isomerase; SC5DL, Sterol C5-desaturase; DHCR7, Sterol Δ 7-reductase; DHCR24, Sterol Δ 24-reductase