

コンドウ カズオ  
近藤 和雄

**共同研究者**

谷 真理子

(お茶の水女子大学 生活環境教育研究センター 研究機関研究員)

岸本良美

(お茶の水女子大学大学院 博士後期課程)

飯塚麻貴

(お茶の水女子大学大学院 博士後期課程)

**略 歴**

1979年3月	東京慈恵会医科大学卒業
1981-1984年	東京慈恵会医科大学青戸病院内科助手
1984-1990年	防衛医科大学校第一内科助手
1986年11月	博士(医学)取得
1986-1988年	ベーカー医学研究所(豪)訪問研究員
1990-1992年	防衛医科大学校病院講師(第一内科)
1992-1999年	国立健康・栄養研究所 臨床栄養部 臨床栄養指導室長
1999-	お茶の水女子大学 教授

果実ポリフェノールのマクロファージ泡沫化に及ぼす影響に関する研究

Inhibitory effect of polyphenol on macrophage foam cell formation

The Mediterranean diet, containing balsamic vinegar, is associated with low rate of cardiovascular disease. Oxidized LDL play an important role in atherosclerosis via stimulating macrophage foam cell formation. In this study, we investigated effects of balsamic vinegar on LDL oxidation and macrophage foam cell formation.

We measured total polyphenol concentrations, DPPH radical scavenging activities and LDL oxidizability by lag time assay. We determined TBARS products and LDL mobility on HUVEC-mediated LDL oxidation. We investigated the foam cell formation of macrophage derived from THP-1 cells by Oil red O staining and measurement of intracellular triglycerides and cholesterols. The protein expressions of scavenger receptors (SR-A, CD36, LOX-1) were detected by western blot and the mRNA expressions were determined by real time PCR.

Balsamic vinegar had DPPH radical scavenging abilities and total polyphenol concentrations of  $2.1 \pm 0.1$  mg/mL. The lag time prolongation rate relative to the control was  $1.8 \pm 0.7$  ( $p < 0.001$ ). Balsamic vinegar decreased TBARS production and LDL mobility on cell-mediated LDL oxidation. The concentrations of intracellular triglycerides and cholesterols were reduced in the presence of balsamic vinegar. Balsamic vinegar significantly decreased the expression levels of SR-A, CD36 and LOX-1 protein and mRNA in macrophages.

Balsamic vinegar exerts antioxidant effects on LDL oxidation and inhibits foam cell formation by down regulation of scavenger receptors expression in THP-1 macrophages.

## はじめに

近年、日本における総死亡率の30%を冠動脈疾患が占めており、動脈硬化の予防・治療に期待が集まっている。動脈硬化の発症進展過程において、酸化ストレスなどにより変性したLDLは、スカベンジャー受容体を介してマクロファージに取り込まれる。マクロファージは、変性LDLを際限なく取り込み、泡沫細胞となり、動脈硬化性プラークの形成へとつながる。

動脈硬化の発症進展には、生活習慣の中でも特に食生活が大きく関わっている。我々は、これまでに食品による動脈硬化予防として、ブドウやレモン、ライチなどの果実に含まれるポリフェノールが、LDL酸化抑制作用、食後高脂血症改善作用を示すことを明らかにしてきた。ブドウの機能性に関しては赤ワインの研究報告が数多くなされているが、地中海地方では日常的に摂取されているバルサミコ酢もブドウを原料にしており、種類の異なる樽で12年以上熟成してつくられていることから、ポリフェノールを多く含むことが期待されている。

そこで、本研究では、バルサミコ酢を用いて、動脈硬化発症・進展に重要な役割を果たすLDLに対する抗酸化能、マクロファージの泡沫化および泡沫化に関与するスカベンジャーレセプター発現について検討を行った。

## 実験方法

### 1. バルサミコ酢のLDL酸化に及ぼす影響

#### 1-1. バルサミコ酢における抗酸化能の検討

12年熟成したバルサミコ酢を用い、バルサミコ酢のDPPHラジカル捕捉能による抗酸化作用の検討を行い、さらにその抗酸化作用に対するポリフェノールの影響を検討した。また、LDLの被酸化能の検討として、共役ジエン法によるLDL酸化抑制作用をlag time測定を行った。

#### 1-2. バルサミコ酢摂取におけるLDL被酸化能に及ぼす影響

ヒト負荷での検討として、12年熟成したバルサミコ酢を熱し、酢酸を除去し、ポリフェノール濃度を800 mgに調製したものをサンプルとした。健常成人5人を対象に、バルサミコ酢を負荷し、負荷前、負荷後0.5、1、4 時間後に採血を行った。超遠心法によりLDLを分離し、LDL被酸化能の検討として、lag time測定、LDL中の過酸化脂質(LPO)生成量測定、LDL中のリゾフォスファチジルコリン(LPC)生成量測定、アガロース電気泳動法によるLDL移動度を測定した。

### 2. バルサミコ酢がマクロファージ機能に及ぼす影響

#### 2-1. バルサミコ酢のマクロファージの泡沫化に及ぼす影響

マクロファージの泡沫化に関する検討として、ヒト単球系細胞株 (THP-1)マクロファージを用い、ヒトより分離したLDLと硫酸銅 (10  $\mu$ M)を用いて作製した酸化LDLをマクロファージに添加し、Oil red O染色および、細胞内トリグリセリド・コレステロール濃度の測定を行った。

## 2-2. バルサミコ酢のマクロファージ泡沫化メカニズムに及ぼす影響

泡沫化のメカニズムとして、そのときに発現するスカベンジャーレセプター (SR-A、CD36、LOX-1)の発現量を、real time RT-PCR法、ウエスタンブロットリング法を用いて検討した。

## 結果および考察

### 1. バルサミコ酢のLDL酸化抑制作用

#### 1-1. バルサミコ酢の抗酸化能

LDLの構成要素であるコレステロール、トリグリセリド、リン脂質は、内皮細胞、好中球、マクロファージから発生する活性酸素、銅イオンや鉄イオンなどによって酸化され、変性LDLとなる。LDLレセプターはapoBを認識して取り込む<sup>1)</sup>ため、脂質アルコキシラジカルや脂質ペルオキシラジカルによるapoBが変性している酸化LDLは取り込まれず、マクロファージに多く発現しているスカベンジャーレセプターと結合する。スカベンジャーレセプターは酸化LDLによりフィードバック機構を受けないので、マクロファージは酸化LDLを際限なく取り込み、泡沫細胞となり、動脈硬化症へと進展する。このように酸化LDLは動脈硬化症の原因の一つとなっており、LDLの酸化を防ぐ抗酸化作用は動脈硬化予防につながる。

バルサミコ酢は有意なDPPHラジカル消去能が認められ、バルサミコ酢の1mLあたりのポリフェノール含量は、カテキン換算で約2.5mg/mLであった。また、共役ジエン法によるLDLの被酸化能を測定した結果、バルサミコ酢の添加により有意な延長が認められた( $p < 0.001$ )ことから、バルサミコ酢が強い抗酸化能を有することが示唆された。

#### 1-2. バルサミコ酢摂取におけるLDL被酸化能

酸化LDLでは、脂質の過酸化、apoB蛋白の崩壊、フォスファチジルコチン (PC)のLPCへの分解が起こっている<sup>2)</sup>。LDLが酸化されるとLPOが増加し、LPOが増加することで、構成蛋白のapoBが、雑多な大きさのペプチドに断断され (fragmentation)、そして粒子全体の陰性荷電の増加がみられる。リン脂質分画では、酸化されたPCが認められ、酸化の程度が進むとさらにLPCへと分解される<sup>3)</sup>。

*In vivo*におけるバルサミコ酢のLDL酸化抑制作用を検討するため、健常成人5人を対象に、LDL被酸化能をバルサミコ酢摂取前、摂取0.5、1、4時間後に測定した。

バルサミコ酢摂取前と比較し、lag time測定、LPO生成量測定では摂取1時間後にlag timeの延長、LPO生成量の抑制がみられ、摂取0.5時間後も有意差はみられなかったものの、lag time延長の可能性が示された。このことから、バルサミコ酢摂取0.5時間後から徐々にlag timeが延長し、摂取1時間後に生体内におけるlag time延長能がピークに達することが認められた。LPO生成量においてもバルサミコ酢摂取1時間後に有意な抑制がみられたことから、バルサミコ酢摂取後1時間でLDL酸化を抑制することが考えられた。また、LPC生成量において全ての摂取後経過時間で有意な抑制が確認されたことから、LDL表面のリン脂質分画に対し、バルサミコ酢が持続的にLDLの酸化を抑制する可能性が示唆された。

## 2. バルサミコ酢がマクロファージ機能に及ぼす影響

### 2-1. バルサミコ酢のマクロファージの泡沫化抑制作用

近年、動脈硬化発症進展に重要な役割を果たすマクロファージの泡沫化および泡沫化に関与するスカベンジャーレセプター発現の重要性が注目を集めている。

動脈硬化進展の過程で重要となる動脈硬化性プラークの形成には、マクロファージ細胞による酸化LDLをはじめとする変性LDLの貪食が大きく関与している。マクロファージ細胞は、細胞表面に発現するスカベンジャーレセプターを介して変性LDLを取り込み、取り込んだ変性LDLが過剰になるにつれてマクロファージの泡沫化が進行し、やがて破綻を引き起こす。

バルサミコ酢によりLDLの酸化抑制作用が認められたため、さらなる可能性としてバルサミコ酢のマクロファージ泡沫化抑制作用について検討を行った結果、酸化LDLを作用させなかった場合には赤く染色された脂肪滴は、認められなかった。一方、酸化LDLを作用させた場合には脂肪滴が認められ、THP-1 マクロファージ細胞に酸化LDLを作用することにより、脂肪の蓄積がみられた。また、酸化LDLと共にバルサミコ酢0.1%を作用させると、バルサミコ酢0.01% に対し脂肪滴が減少し、バルサミコ酢により脂肪滴の蓄積抑制が認められた(図1 参照)。

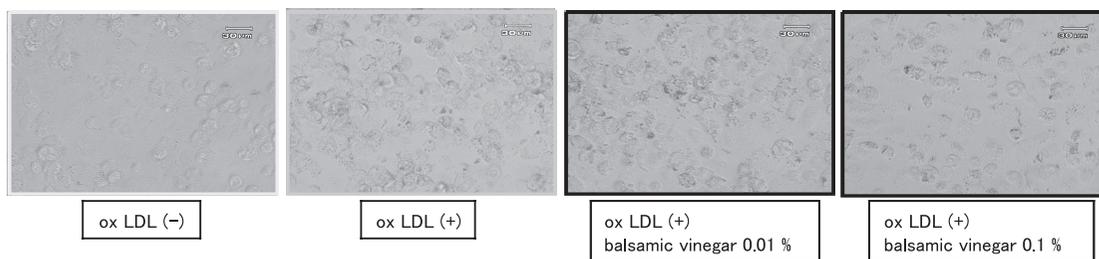


図1 バルサミコ酢のマクロファージ泡沫化に及ぼす作用(Oil red O 染色)

また、細胞内トリグリセリド濃度およびコレステロール濃度は、酸化LDL作用により、有意に増加した ( $P<0.05$ )。バルサミコ酢は、酸化LDLで増加した細胞内トリグリセリド濃度を有意に抑制し ( $P<0.05$ )、細胞内コレステロール濃度も同様に、バルサミコ酢作用により有意に減少した ( $P<0.01$ )。

### 2-2. バルサミコ酢のマクロファージ泡沫化メカニズムの解明

バルサミコ酢がマクロファージへの脂質蓄積を抑制したことから、マクロファージ泡沫化メカニズムの解明として、スカベンジャーレセプターに及ぼす影響を検討した。

SR-AのmRNA発現量は、THP-1 マクロファージ細胞でバルサミコ酢により有意な低下が認められ ( $P<0.01$ )、タンパク発現量も同様に、バルサミコ酢により、有意な発現の低下が認められた。

また、CD36およびLOX-1のmRNA発現量は、バルサミコ酢と有意な発現の低下が認められた ( $P<0.05$ )。タンパク発現量も同様に、バルサミコ酢作用により、有意な発現の低下が認められた。

以上のことより、バルサミコ酢は主要な酸化LDL受容体SR-A、CD36、LOX-1のmRNAおよび、SR-A、CD36、LOX-1のタンパク発現を有意に抑制した。

本研究で得られたTHP-1 マクロファージ細胞へのバルサミコ酢刺激による泡沫化抑制作用には、

SR-A、CD36 及びLOX-1の発現低下による可能性が示唆された。今後、その作用メカニズムについては、MAPK経路をはじめとするシグナル伝達等による検討が必要である。

## まとめ

本研究では、ブドウ果実ポリフェノールを含むバルサミコ酢を用いて、動脈硬化症発症・進展に関わる酸化LDLおよび、マクロファージ機能に及ぼす影響について検討を行った。バルサミコ酢によるLDL酸化抑制作用およびスカベンジャー受容体の発現低下を介したマクロファージ泡沫化抑制作用が示され、果実ポリフェノールが動脈硬化予防に寄与する可能性が示唆された。

## 謝 辞

本研究を遂行するにあたり、財団法人アサヒビール学術振興財団に助成金を頂きましたことを深く感謝申し上げます。

## 参考文献

1. Brown MS, Goldstein JL. A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. *Science*. 1986; 232:34-47
2. Steinberg D, Parthasarathy S, Carew TE, Khoo JC, Witztum JL. Beyond cholesterol. Modifications of low-density lipoprotein that increase its atherogenicity. *N Engl J Med*. 1989; 320:915-924
3. Steinberg D, Witztum JL. Lipoproteins and atherogenesis. Current concepts. *Jama*. 1990; 264:3047-3052

