

生体過酸化脂質の生成と制御に関する食品科学的研究

Studies on lipid peroxidation in human disease: its modulation from the view point of food chemistry



宮澤 陽夫 (MIYAZAWA TERUO)

東北大学・大学院農学研究科・教授

研究の概要

生体の脂質は酸化されると過酸化脂質（脂質ヒドロペルオキシド）を生じる。これが細胞や臓器機能の低下、動脈硬化、認知症の要因になることを、化学発光分析、質量分析、培養細胞試験、ヒト血液分析により明らかにした。食品からの、ビタミンE、ポリフェノール、カロテノイドの摂取は、これらの脂質過酸化を抑制し、老化性の疾病予防に有効なことを明らかにした。

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・食品科学

キーワード：過酸化脂質、脂質ヒドロペルオキシド、動脈硬化症、認知症、食品機能

1. 研究開始当初の背景

過酸化脂質は食品油脂の酸化劣化として従来研究されてきていたが、申請者は、生体内とくに血管や生体膜脂質の過酸化が、細胞老化や生活習慣病あるいは老化性疾患に深く関与すると考え、食品領域の過酸化脂質研究を生体系に発展させようと考え研究を進めてきていた。

2. 研究の目的

生体に存在する過酸化脂質（脂質ヒドロペルオキシド）をCL-HPLC法とLC-MS/MS法で分子種レベルで定量し、疾病（動脈硬化症や認知症）との量的関係と疾病の要因としての過酸化脂質の関与分子機構を解明し、さらに食品成分による生体過酸化脂質の生成制御と老化性疾病の予防について、基盤的な理解を得ることが目的である。

3. 研究の方法

高純度過酸化脂質標品の合成法を確立し、臨床標本、動物組織、培養細胞の過酸化脂質を、CL-HPLC法とLC-MS/MS法で定量し、脂質ヒドロペルオキシドの生成と細胞障害機構を培養細胞試験と遺伝子発現解析で明らかにし、食品成分による脂質過酸化抑制能をヒト試験と動物試験で解析する。

4. これまでの成果

(1) ビニルエーテルによる高純度過酸化脂質標品の調製技術を確立した。2-methoxypropeneをヒドロペルオキシド基に付加して保護し、ヒドロペルオキシド型過酸化脂質（LOOH、脂質ヒドロペルオキシド）を高純度に得る方法を開発した。これによりホスファチジルコリンヒドロペルオキシド（PCOOH）（純度99.8%）の使用を可能にした。グリセロリン脂質、コレステロール、コレステロールエテル、トリアシルグリセロール、脂肪酸のヒドロペルオキシド標品を調製出来るようにした。これらはいずれも世界初である。国際会議ICLH2009を開催した。国内外に高純度脂質ヒドロペルオキシド標品を配布できるようにした。これにより、脂質ヒドロペルオキシド自体の生理作用が新たに発見され、その分子機構の解明に寄与した。

(2) CL-HPLC法とともにLC-MS/MS法による、ヒト血漿、赤血球、皮脂などの過酸化脂質（脂質ヒドロペルオキシド）の分子種レベルの定量を可能にした。高脂血症、糖尿病、動脈硬化症の血漿、認知症の赤血球膜で、リン脂質ヒドロペルオキシド（PCOOH）の蓄積が顕著なことを確認した。とくに動脈硬化の発症において、PCOOHが単球の血管内皮ICAM-1への接着を引き起こし、動脈硬化発症の要因になる機構を解明した。PCOOHは、血管内皮細胞においてVEGF依存性の血管新生作用を強く

亢進させ、動脈硬化の原因になる炎症を強く惹起する物質であることを発見した。

(3) 過酸化脂質 (脂質ヒドロペルオキシド) の個々の分子種を一斉網羅的に検出し定量できるように、LC-MS/MS法の解析条件の最適化に成功した。この条件をリニアイオントラップ型ハイブリッド質量分析装置 4000QTRAP MS/MS (Applied Biosystems) に導入して、Multiple Reaction Monitoring (MRM) モードで脂質ヒドロペルオキシド分子種を構造解析し定量している。この過程で、脂質の MS/MS 分析で課題となるイオンサプレッション (検出感度低下の原因) を防ぐ技術を見出し、ヒト血中や培養細胞中の極微量の過酸化脂質について、例えば、最少検出量 0.1 pmol/ml の PCOOH の超高感度定量に世界で初めて成功した。また、本法を用い、糖尿病で生成する糖化リン脂質 (アマドリ型ホスファチジルエタノールアミン、deoxy-D-fructosyl PE) とともに後期糖化産物であるカルボキシメチル PE とカルボキシエチル PE のヒト血中の存在を証明し、高血糖状態を把握できる一連の新マーカーを発見した。

(4) 食品成分による生体過酸化脂質の生成の抑制と老化性疾病预防の可能性を検証した。生体内の脂質ヒドロペルオキシドの生成を抑制できる食品成分として、緑茶カテキン、ポリフェノール類、スルフォラファン、ビタミン E 類 (トコフェロールとトコトリエノール) の効能を、ヒト試験、動物試験、培養細胞試験で明らかにした。また、ビタミン E とポリフェノールによる抗酸化相乗作用を明らかにした。これらはとくに高脂血症、糖尿病、動脈硬化などでの血中過酸化脂質の増加の抑制に効果的であると考えられた。また、血管内皮における抗炎症作用も観察されたので、これら障害の進行予防に役立つと考えられた。認知症に関しては、血中に特徴的に出現する老化赤血球 (PLOOH 多含赤血球: 酸化ヘモグロビンからの酸素分子の解離が阻害され神経細胞への酸素供給能が低下した状態の赤血球を意味する) の生成蓄積を予防できるキサントフィルの抗酸化機能とアミロイドβによる赤血球膜脂質の過酸化機構を明らかにした。

日本を含む多くの先進諸国で、長寿と老化予防、疾病预防への食品の果たす役割の解明が社会的な大きな関心事のひとつになっている。本研究は、「生体の老化や疾病に生体膜リン脂質の過酸化が関与することをヒトについて実証し、この予防に役立つ食品および食品成分を、最先端の機器分析と分子レベルの研究によって明らかにする」という目標で進めている。

5. 今後の計画

生体に生じる過酸化脂質の精密分析、高純度標準品の合成と供給、過酸化脂質分析法の抗体作製による汎用化、細胞障害と疾病 (動脈硬化症、糖尿病、癌、認知症) 発生への過酸化脂質の分子機構の解明、食品成分による過酸化脂質の生成抑制と疾病予防について、これまでの知見を基盤にして一層の研究推進を計る。また、形質膜、核膜、小胞体膜、ゴルジ体膜、リソソーム膜、ペルオキシソーム膜、ミトコンドリア膜などの細胞膜の過酸化脂質分布を解析し、細胞小器官レベルで酸化ストレスの発生源を探索同定する。

6. これまでの発表論文等 (受賞等も含む)

- 1) A. Asai, F. Okajima, Y. Nakajima, M. Nagao, K. Nakagawa, T. Miyazawa, S. Oikawa, Involvement of Rac GTPase activation in phosphatidylcholine hydroperoxide-induced THP-1 cell adhesion to ICAM-1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 406, 273-277 (2011)
- 2) N. Shoji, K. Nakagawa, A. Asai, I. Fujita, A. Hashiura, Y. Nakajima, S. Oikawa, T. Miyazawa, LC-MS/MS analysis of carboxymethylated and carboxyethylated phosphatidylethanolamines in human erythrocytes and blood plasma. *J. Lipid Res.*, 51, 2445-2453 (2010)
- 3) A. Asai, F. Okajima, K. Nakagawa, D. Ibusuki, K. Tanimura, Y. Nakajima, M. Nagao, M. Sudo, T. Harada, T. Miyazawa, S. Oikawa, Phosphatidylcholine hydroperoxide-induced THP-1 cell adhesion to intracellular adhesion molecule-1. *J. Lipid Res.*, 50, 957-965 (2009)
- 4) D. Ibusuki, K. Nakagawa, A. Asai, S. Oikawa, Y. Masuda, T. Suzuki, T. Miyazawa, Preparation of pure lipid hydroperoxides. *J. Lipid Res.*, 49, 2668-2677 (2008)
- 5) K. Nakagawa, T. Kiko, K. Hatade, A. Asai, F. Kimura, P. Sookwong, T. Tsuduki, H. Arai, T. Miyazawa, Development of a high-performance liquid chromatography-based assay for carotenoids in human red blood cells. *Anal. Biochem.*, 381 (1), 129-134 (2008)

宮澤陽夫、安藤百福賞「生体脂質の過酸化と抗酸化に関する研究」2010年、宮澤陽夫、飯島食品科学賞「食品ポリフェノールの吸収代謝と抗酸化機能に関する研究」2010年、宮澤陽夫、日本栄養・食糧学会賞「脂質の食品化学的研究」2009年

ホームページ等

<http://www.agri.tohoku.ac.jp/kinoubunshi/index-j.html>