

<平成23年度助成>

クルクミンによる コレステロール吸収抑制・排出作用に関する研究

近藤 春美

(防衛医科大学校内科学講座)

緒言

動脈硬化性疾患、ことに心血管系疾患と脳梗塞・脳血管障害による死亡は、日本人の死因統計上がんと並んで大きな位置を占め、死因の約30%に及んでいる。動脈硬化の発症は、血管内皮下に進入した低比重リポタンパク (LDL) が酸化変性を受け、マクロファージに貪食されて泡沫化することから始まると考えられている。従来より、コレステロール合成阻害薬であるスタチンを使った LDL 低下療法が心血管疾患リスクの軽減に有効であることが大規模臨床試験によって示されてきたが、その予防効果は3割程度に留まる。一方、高比重リポタンパク (HDL) は、国内外の数多くの疫学調査において心血管疾患と負の相関関係と示すことから、抗動脈硬化性リポ蛋白と考えられている。これは、HDLが動脈硬化巣マクロファージの余剰なコレステロールを引抜き、肝臓、さらには胆汁を介して糞便中へと排出する抗動脈硬化機能を有するからである¹⁾。最近、このHDL機能と同様に、小腸におけるコレステロール吸収制御もコレステロール逆転送活性化戦略のひとつとして脚光を浴びている²⁾。新たな高コレステロール血症治療薬として開発されたエゼチミブは、多くの候補化合物から網羅的な探索によりコレステロール吸収を阻害する化合物として発見されたが、後に、小腸の管腔側膜上に局在するコレステロールトランスポーターであるNPC1L1 (Niemann-pick C1 like 1) の細胞外ループに結合し構造を変化させることで、コレステロールの吸収を非競合的に

阻害することによりコレステロール吸収阻害作用を発揮することが明らかとなった。ストロングスタチンといわれる LDL 低下効果の高いスタチンは NPC1L1 発現を増加させることにより小腸からのコレステロール吸収を亢進させる。そのため本来持つ LDL 低下効果が減弱する「スタチン抵抗性」が現れる。我々は、最近エゼチミブがコレステロール吸収抑制のみならず、コレステロール逆転送を活性化することをハムスターで見出した³⁾。その活性化作用はHDLの量や機能とは独立して発揮され、コレステロール逆転送におけるコレステロール吸収阻害の重要性が示唆された。一方、いくつかのポリフェノールはコレステロール吸収阻害作用を有することが示されているが、その作用機序は不明であった。しかし、近年ウコンのポリフェノールであるクルクミンのHDL増加作用などに加え⁴⁾、小腸上皮様細胞Caco2細胞のNPC1L1発現を減少させてコレステロール吸収を阻害することが報告されている^{5,6)}。従って、クルクミンはエゼチミブと同じく小腸におけるコレステロール吸収を阻害しコレステロール逆転送活性化作用を有することが期待できる。そこで本研究では、クルクミンによる小腸コレステロール吸収阻害およびコレステロール逆転送活性化について検討することを目的とした。

材料および方法

試薬

クルクミンはシグマ社、³H-コレステロールはパーキン・エルマー社より購入した。

実験動物および実験群

Golden Syrian ハムスターは日本エスエルシー(株)より4週齢の雄性ハムスターを購入し、1週間の馴化飼育後に実験食投与を開始した。実験群は、実験1:NC(MF)のみのNC群と0.05%クルクミンを添加したNC+Curcumin群、実験2:NCに0.5%コレステロールを添加したHC群と0.05%クルクミンを添加したHC+Curcumin群、実験3:表1に実験で用いた餌の成分表を示す。AIN76に10%ココナッツオイルと0.2%コレステロールを添加したHFHC群と0.05%クルクミンを添加したHFHC+Curcumin群を用いた。なお、動物実験に関しては、防衛医科大学校における動物実験の実施に関する規程を遵守した。

表1

Composition of diet	HFHC	HFHC+ Curcumin
	g/kg diet	
casein	200	200
mineral mixture	35	35
vitamin mixture	10	10
choline chloride	2	2
coconuts oil	100	100
corn oil	50	50
cholesterol	2	2
cellulose powder	50	50
sucrose	500	500
corn starch	48	47.5
DL-methyonine	3	3
curcumin	0	0.5

血清脂質の測定

投与前後に得られた血漿を脂質測定に使用し、総コレステロール(TC)とHDL-CをそれぞれコレステロールE-テストワコーおよびHDL-コレステロールE-ワコー(和光純薬工業(株))を用いて測定した。

リポ蛋白は、中高圧液体クロマトグラフィーシステム(GEヘルスケア(株))を用いて分離を

行い、総コレステロールを測定した。

肝臓中脂質の測定

肝臓はPBSでホモジナイズした後に、クロロホルム:メタノール(=2:1, Vol/Vol)を加え、1000 rpm、10分間の後、クロロホルム層を回収した。窒素ガスで蒸散させた後、10% TritonX100イソプロピルアルコールで再溶解し、TC、およびTGをそれぞれコレステロールE-テストワコーおよびトリグリセライドE-ワコー(和光純薬工業(株))を用いて測定した³⁾。

総RNA抽出およびリアルタイム RT-PCR

空腸25 mgを1 mlのTRIzol試薬(TaKaRa)でホモジナイズし総RNAの抽出を行い、これを鋳型として、TaqMan Reverse Transcription Reagents (Applied Biosystems)を用いてcDNAを得た。Real-time PCRによる増幅反応には、ABI Prism 7900 (Applied Biosystems)を用いた³⁾。

腹腔マクロファージの採取

6-8週齢の雄性ハムスターに、2.5 MBq/匹の³H-コレステロールおよび54.3 μL/匹のイントラリポス20%(大塚製薬工場(株))を含む生理食塩水を0.5 mL腹腔注射した。24時間後、ハムスターの腹部を消毒し、皮膚を切開し腹膜を露出させ、下腹部より4℃に冷却した0.5% BSA/2 nMEDTA/PBS(B/E-PBS)を注射筒で10 mL腹腔内に注入し、腹部を指で振盪させた後に注入に用いた注射筒で回収した。B/E-PBSの注入・回収は1匹あたり2回ずつ行った。採取した腹腔マクロファージは遠心管に入れ、1000 rpm、5分間遠心し、0.5 mLのDMEM培地に懸濁した³⁾。

コレステロール逆転送実験

図1に実験方法を示す。実験食投与後、上記のように³Hをラベルしたハムスターの腹腔マクロファージをハムスターに0.5 mLずつ腹腔注射した。腹腔注射24、48および72時間後に胸部

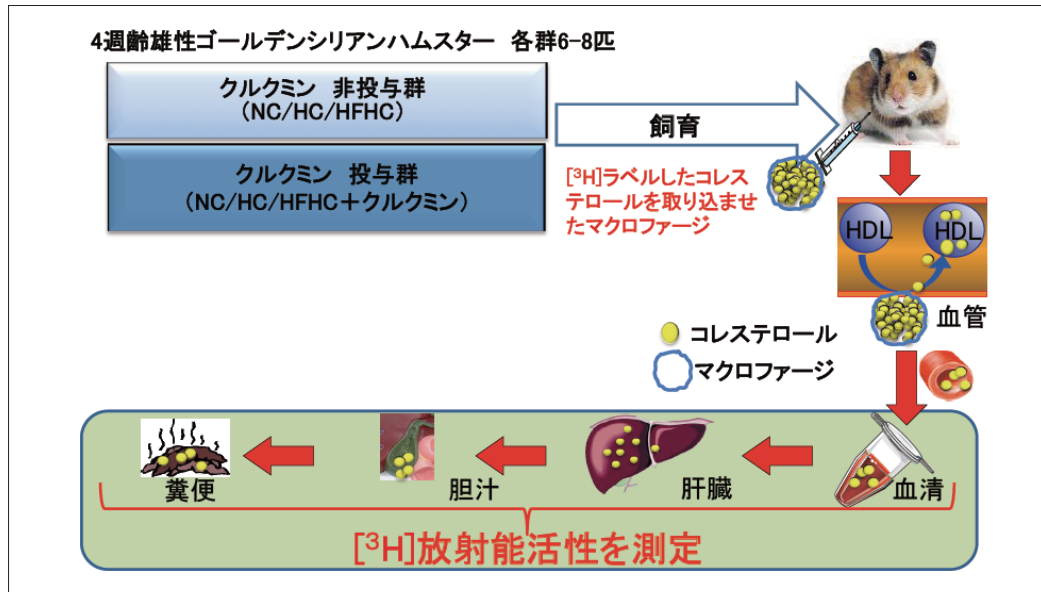


図1 クルクミンによるコレステロール逆転送実験

雄性ゴールデンシリアンハムスターをクルクミン非投与群と投与群に分け、飼育の後、³H-cholesterolで標識した腹腔マクロファージを腹腔注射した後、血液、肝臓、胆汁、糞便中の³H量を測定する。

大静脈から採血し血漿を得た。4時間の空腹期間をおき、腹腔注射72時間後に安楽死させ、4℃に冷却したPBSを心臓から還流したのち、肝臓、空腸と胆嚢を採取した。肝臓はPBSでホモジナイズした後に、クロロホルム：メタノール(= 2:1, Vol/Vol)を加え、1000 rpm、10分間の後、クロロホルム層を回収した。窒素ガスで蒸散させた後、ヘキサン：イソプロピルアルコール(= 3:2, Vol/Vol)で再溶解し、³Hの放射活性を液体シンチレーションカウンターで測定した。胆嚢は直接穿刺し、胆汁2 μLの³Hの放射活性を測定した⁷⁾。糞便は腹腔マクロファージを注射後72時間まで集め、便100 mg当たり1 mLの水を加え16時間、4℃で浸漬した後、同量のエタノールを加えてホモジナイズし、便中に含まれる³H放射活性を液体シンチレーションカウンターで測定した^{3,7)}。

コレステロール引き抜き能

HDLを13%ポリエチレン6000溶液(和光純薬工業(株))を用いて分取した。J774マクロファージに³H-コレステロール2 μCi/mLおよび0.2% BSAを含むRPMI培地を添加し細胞を標

識した。24時間後、0.2% BSA-PBSで洗浄し、2.8%のHDLを含むRPMIを添加した。4時間後、培地上清を回収、細胞内の脂質は脂質溶解液(ヘキサン：イソプロパノール= 1:1)で抽出し、培地上清と細胞脂質抽出液の放射活性を液体シンチレーションカウンターで計測した。コレステロールの引き抜き能は、培地上清のカウントを細胞のカウントで除することで算出した³⁾。

統計学的処理

結果は平均±標準偏差で表した。統計学的検定には検定ソフトJMP4.0(SASインスティテュートジャパン社)を用い、独立2群間の検定としてStudent's t検定を用いた。有意水準を0.05とし、p<0.05を有意差ありと判断した。

結 果

実験1. HDL機能によるクルクミンのコレステロール逆転送作用の検討

前述したように、コレステロール逆転送作用には、「HDL機能の改善による経路」と「コレステロール吸収阻害による経路」が考えられる。我々

は、コーヒーや緑茶、ワインなどの飲料や果物、野菜などに豊富に含まれているポリフェノールに注目し、コレステロール逆転送作用への影響の観点から研究を進めてきた。その中で、コーヒー中のポリフェノールであるフェルラ酸がHDLによるコレステロール引き抜き能の改善によってコレステロール逆転送を促進することを明らかにし⁷⁾、アントシアニンにも同作用を有することが報告されている⁸⁾。そこで、まず我々はウコンポリフェノールであるクルクミンのHDL機能によるコレステロール逆転送作用をNC食を用いて検討した。NC群とNC+Curcumin群に分け、4週間摂取させ、³Hラベルマクロファージを腹腔注射後24、48、72時間の血漿の³HレベルはNC+Curcumin群とNC群で明らかな差を認めなかった(図2A)。また、肝臓(図2B)、胆汁(図2C)、糞便中(図2D)の³HレベルもNC群とNC+Curcumin群との間で有意な差は認められなかった。このことから、クルクミンはHDL機能によるコレステロール逆転送に影響を及ぼさない可能性が示された。

実験2. コレステロール吸収阻害によるクルクミンのコレステロール逆転送作用の検討

最近、我々はコレステロール吸収阻害剤エゼチミブがHC食下のハムスターにおいてコレステロール逆転送を促進することを明らかにした³⁾。一方、クルクミンはCaco2細胞のNPC1L1発現を減少させてコレステロール吸収を阻害することが報告されている^{5,6)}。そこで、我々はクルクミンのコレステロール吸収阻害によるコレステロール逆転送作用をHC食を用いて検討した。まず、HC群とHC+Curcumin群に分け、12週間摂取させ、血清脂質濃度に及ぼす影響を検討した。その結果、HC+Curcumin群はHC群に比べてTC, HDL-Cおよびnon-HDL-Cと全ての血清脂質およびFPLCによるリポ蛋白分析において統計学的に明らかな差を認めなかった(図3Aと図3B)。また、肝臓中脂質濃度と肝臓重量に関してもHC+Curcumin群とHC群で変化は見られなかった(図4Aと4B)。図5Aに示すとおり、³Hラベル腹腔注射24、48、72時間後の血漿の

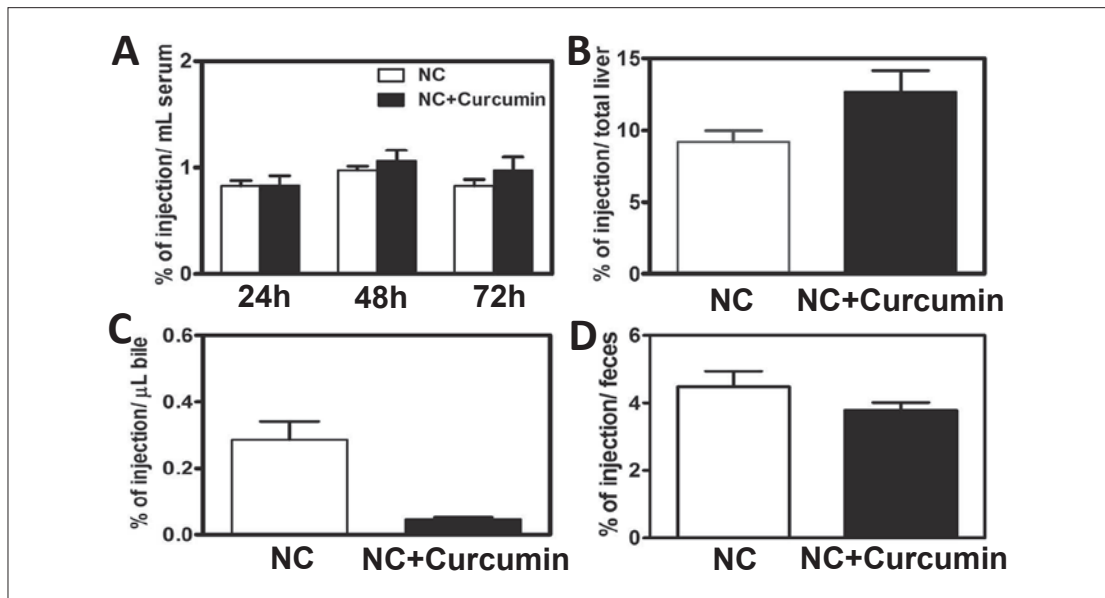


図2 NC食下におけるクルクミンのコレステロール逆転送に及ぼす影響
通常(NC)食およびクルクミン添加(NC+Curcumin)食を4週間投与し、³Hをラベルしたマクロファージを腹腔注射後、血清(A)、肝臓(B)、胆汁(C)および糞便中(D)の³H放射活性を液体シンチレーションカウンターで測定した。データは平均±標準誤差(各6検体)を示す。

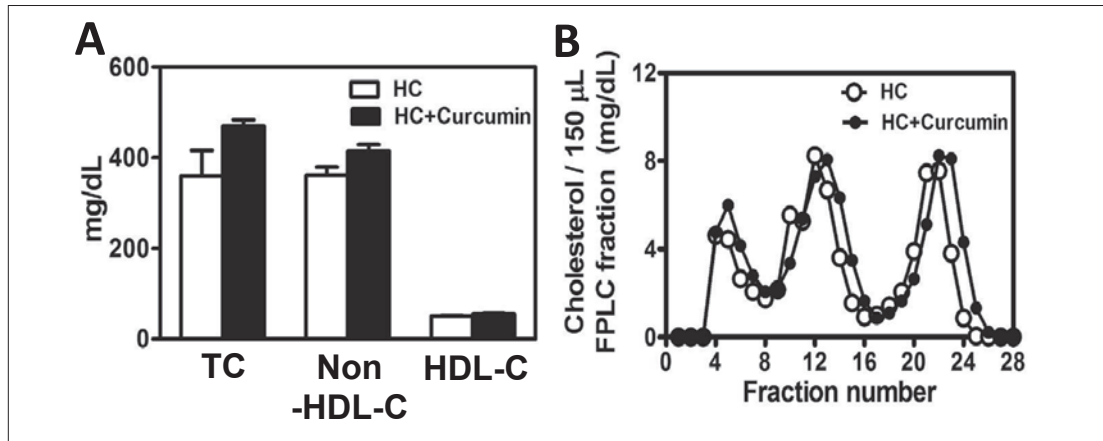


図3 HC食下におけるクルクミンの血清脂質濃度に及ぼす影響

高コレステロール(HC)食およびクルクミン添加(HC+Curcumin)食を12週間投与後、採血を行い、TC、TGおよびHDL-Cを測定した。Non-HDL-CはTCからHDL-Cをひいて算出した。データは平均±標準誤差(各8検体)を示す。

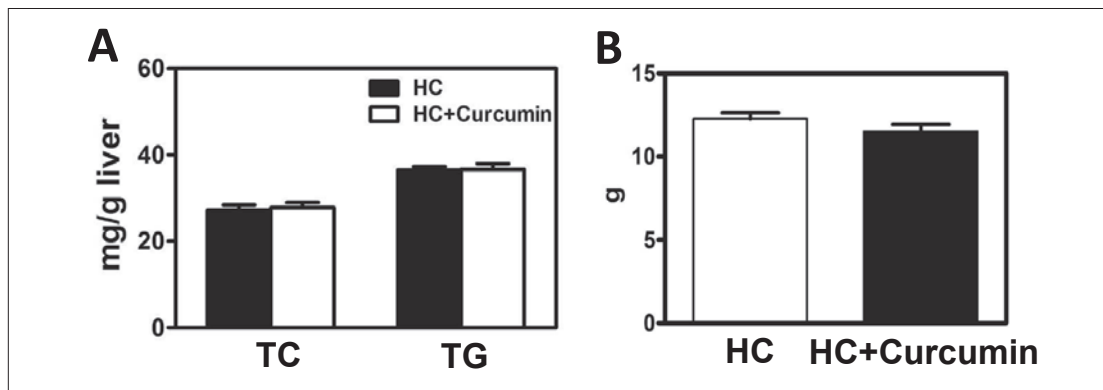


図4 HC食下におけるクルクミンの肝臓中脂質濃度および重量に及ぼす影響

高コレステロール(HC)食およびクルクミン添加(HC+Curcumin)食を12週間投与下におけるコレステロール逆転送実験施行後、解剖を行い、肝臓を採取し、脂質抽出を行い、TCおよびTGを測定した。データは平均±標準誤差(各8検体)を示す。

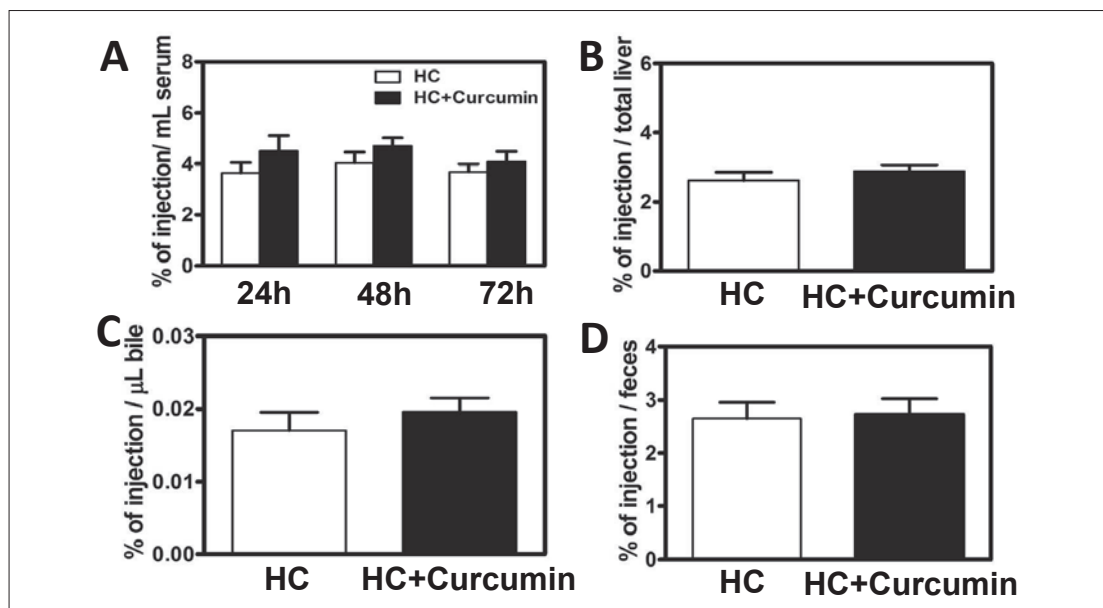


図5 HC食下におけるクルクミンがコレステロール逆転送に及ぼす影響

^3H をラベルしたマクロファージを腹腔注射後、血清(A)、肝臓(B)、胆汁(C)および糞便中(D)の ^3H 放射活性を液体シンチレーションカウンターで測定した。データは平均±標準誤差(各8検体)を示す。

³HレベルはHC+Curcumin群とHC群で明らかな差を認めなかった。また、肝臓(図5B)、胆汁(図5C)、糞便中(図5D)の³HレベルもHC群とHC+Curcumin群との間に差異はなかった。次に、クルクミン摂取により小腸のNPC1L1発現が減少し、コレステロール吸収が抑制されるという報告があることから^{4,6)}、空腸のコレステロール吸収および排出の遺伝発現を測定した。図6に示すように、コレステロール吸収にかかわる遺伝子であるNPC1L1、コレステロール排出にかかわる遺伝子であるABCG5およびABCG8のmRNA発現量は、HC+Curcumin群とHC群で明らかな差を認めなかった。これらの結果から、クルクミンはコレステロール吸収阻害作用によるコレステロール逆転送に影響を及ぼさない可能性が示された。

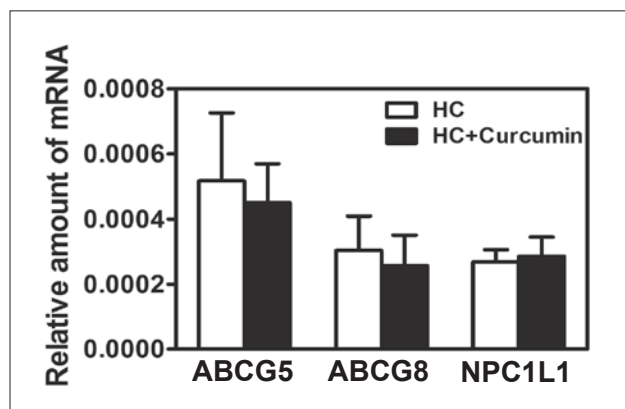


図6 HC食下におけるクルクミンの空腸遺伝子発現に及ぼす影響
高コレステロール(HC)食およびクルクミン添加(HC+Curcumin)食を12週間投与下におけるコレステロール逆転送実験施行後、解剖を行い、空腸を採取し、ABCG5、ABCG8、NPC1L1のmRNAレベルを測定した。データは平均±標準誤差(各8検体)を示す。

実験3. HDL-C量増加によるクルクミンのコレステロール逆転送作用の検討

現在、HDLの質および量の両面でコレステロール逆転送作用は重要とされている。実験1のNC下のコレステロール逆転送実験において、クルクミンにはHDL機能に影響を及ぼさないことが示された。一方で、クルクミンはHFHC食ハムスターにおけるHDL-C増加作用が報告されている⁴⁾。そこで、クルクミンのHDL-C量増加によるコレステロール逆転送作用をHFHC食を用いて検討した。

餌は、Jangらと同じ組成(表1)で調整し、HFHC群とHFHC+Curcumin群に分けた後、同じく9週間摂取させ、血清脂質濃度に及ぼす影響を検討した。その結果、HFHC+Curcumin群はHFHC群に比べてTC、HDL-Cおよびnon-HDL-Cにおいて統計学的に有意な差を認めなかった(図7)。

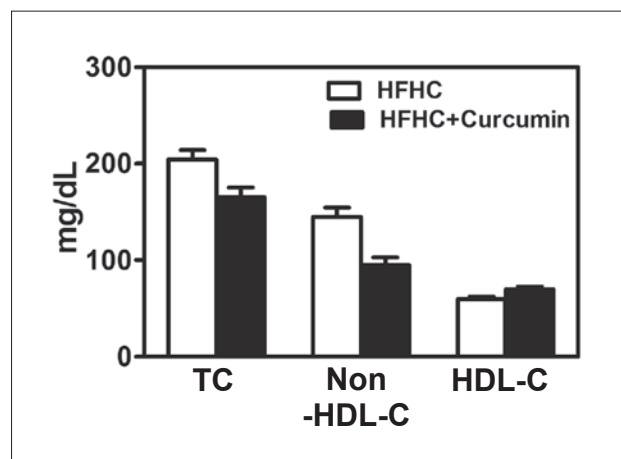


図7 HFHC食下におけるクルクミンの血清脂質濃度に及ぼす影響
高コレステロール(HFHC)食およびクルクミン添加(HFHC+Curcumin)食を9週間投与後、採血を行い、TC、TGおよびHDL-Cを測定した。Non-HDL-CはTCからHDL-Cをひいて算出した。データは平均±標準誤差(各8検体)を示す。

また、図8Aに示すとおり、腹腔注射24、48、72時間後の血漿の³HレベルはHFHC+Curcumin群はHFHC群と比べて有意な差を認めなかったが、増加する傾向を示した。また、肝臓(図8B)、胆汁(図8C)、糞便中(図8D)の³HレベルもHFHC群とHFHC+Curcumin群で有意な差は認められなかった。さらに、*ex vivo*でのコレステロール引き抜き実験として、各群の血清より分取したHDLを用いて培養マクロファージ細胞からのコレステロール引き抜き能を測定したが、HFHC群とHFHC+Curcumin群で差は認められなかった(図9)。これらの結果から、クルクミンはHFHC投与ハムスターにおいてHDL-C量の増加およびコレステロール逆転送に影響を及ぼさない可能性が示された。

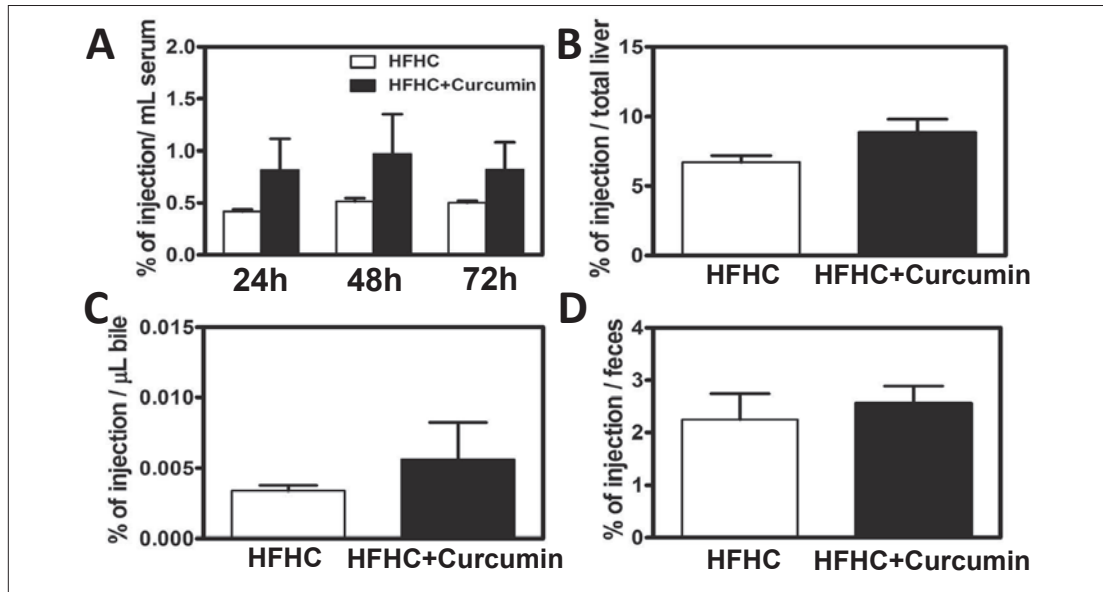


図8 HFHC食下におけるクルクミンのコレステロール逆転送に及ぼす影響
 ^3H をラベルしたマクロファージを腹腔注射後、血清(A)、肝臓(B)、胆汁(C)および糞便中(D)の ^3H 放射活性を液体シンチレーションカウンターで測定した。データは平均±標準誤差(各8検体)を示す。

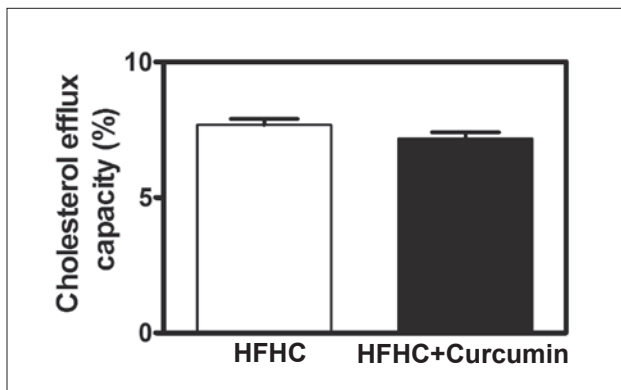


図9 HFHC食下におけるクルクミン投与ハムスターのHDLがコレステロール引き抜き能に及ぼす影響

^3H をラベルしたJ774マクロファージに、2.8%のHDLを含む培地を添加して4時間培養した。培地上清を回収、細胞内の脂質は脂質溶解液で抽出し、培地上清と細胞脂質抽出液の放射活性を液体シンチレーションカウンターで計測した。データは平均±標準誤差(各8検体)を示す。

考 察

現在、心疾患および脳血管疾患は日本人の死因の第二位であり、その危険因子である高コレステロール血症を防ぐことは急務である。臨床的に病氣と診断されエゼチミブが処方されるより先に、日々摂取する食品により消化管からのコレステロール吸収を穏やかに阻害することができれば、生活の質を下げることなく病気を未然に防ぐことができ、高コレステロール血症の予防、ひいては

動脈硬化や心筋梗塞の予防が期待できる。ウコンのポリフェノールであるクルクミンは以前よりコレステロール吸収抑制作用を有することが報告されており、2008年頃より小腸のコレステロール吸収に関与する重要な分子NPC1L1の遺伝子・蛋白発現を減少させること、さらには転写レベルで制御して、コレステロール吸収を抑制することが報告されてきた^{5,6)}。一方、我々はNPC1L1の阻害薬であるエゼチミブがコレステロール逆転送作用を活性化することを明らかにした。そこで、我々は実験2においてクルクミンの小腸コレステロール吸収阻害によりコレステロール逆転送を活性化すると仮定して検討したが、クルクミンの投与によりコレステロール逆転送およびNPC1L1発現に変化は認められなかった。我々のデータと一致して、最近 NekohashiらがCaco2細胞にコレステロールの吸収を抑制するポリフェノールのスクリーニングを行った結果、クルクミンを作用させてもコレステロール吸収抑制作用がないことを報告している⁹⁾。今回の我々のデータや Nekohashiらのデータとこれまでのデータとの乖離の理由は不明だが、今後クルクミンがコレステロールを吸収抑制

するか、真偽やその他の実験手技・手法による解明が望まれる。また、コレステロール逆転送には本研究課題であるコレステロール吸収阻害を介した経路とHDL機能であるコレステロール引き抜き能の改善を介した経路があるが、実験1の結果のとおり、クルクミンがHDL機能を介するコレステロール逆転送作用を有さないことが示された。また、実験3は、Jangらとまったく同じ餌組成および飼育条件で実験を行ったが、HDL-Cの有意な増加およびコレステロール逆転送の活性化は認められなかった。しかし、HFHC食下でのクルクミン投与で、HDL-Cとコレステロール逆転送実験での血中と糞便中への³Hラベルコレステロール排出増加傾向が見られたことから、今後は投与期間の延長やハムスターの引数の増加などの実験条件を変更して、再検討を行っていく予定である。今回のクルクミンを用いたコレステロール逆転送実験はNC、HCおよびHCHF食において変化は認められなかったが、最近になりクルクミンの以外の多数のポリフェノールにコレステロール吸収抑制作用があることが報告された⁹⁾。今後もコレステロール吸収抑制の観点から、コレステロール逆転送作用を有するポリフェノールの探索および機序の解明を進めていきたいと考えている。

謝 辞

本研究の遂行にあたり、貴重な研究助成を賜りました(公財)浦上食品・食文化振興財団およびその関係者の皆さまに心より感謝申し上げます。貴

財団の益々のご発展をお祈り申し上げます。

文 献

- 1) Duffy D, Rader DJ (2009) Update on strategies to increase HDL quantity and function. *Nat Rev Cardiol* 6: 455-63.
- 2) Xie P, Jia L, Ma Y, Ou J, Miao H, Wang N, Guo F, Yazdanyar A, Jiang XC, Yu L (2013) Ezetimibe inhibits hepatic Niemann-Pick C1-Like 1 to facilitate macrophage reverse cholesterol transport in mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 33: 920-5.
- 3) Uto-Kondo H, Ayaori M, Sotherden GM, Nakaya K, Sasaki M, Yogo M, Komatsu T, Takiguchi S, Yakushiji E, Ogura M, Nishida T, Endo Y, Ikewaki K (2014) Ezetimibe enhances macrophage reverse cholesterol transport in hamsters: contribution of hepato-biliary pathway. *Biochim Biophys Acta* 1841: 1247-55.
- 4) Jang EM, Choi MS, Jung UJ, Kim MJ, Kim HJ, Jeon SM, Shin SK, Seong CN, Lee MK (2008) Beneficial effects of curcumin on hyperlipidemia and insulin resistance in high-fat-fed hamsters. *Metabolism* 57: 1576-83.
- 5) Kumar P, Malhotra P, Ma K, Singla A, Hedroug O, Saksena S, Dudeja PK, Gill RK, Alrefai WA (2011) SREBP2 mediates the modulation of intestinal NPC1L1 expression by curcumin. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 301: G148-55.
- 6) Feng D, Ohlsson L, Duan RD (2010) Curcumin inhibits cholesterol uptake in Caco-2 cells by down-regulation of NPC1L1 expression. *Lipids Health Dis* 9: 40.
- 7) Uto-Kondo H, Ayaori M, Ogura M, Nakaya K, Ito M, Suzuki A, Takiguchi S, Yakushiji E, Terao Y, Ozasa H, Hisada T, Sasaki M, Ohsuzu F, Ikewaki K (2010) Coffee consumption enhances high-density lipoprotein-mediated cholesterol efflux in macrophages. *Circ Res* 106: 779-87.
- 8) Wang D, Xia M, Yan X, Li D, Wang L, Xu Y, Jin T, Ling W (2012) Gut microbiota metabolism of anthocyanin promotes reverse cholesterol transport in mice via repressing miRNA-10b. *Circ Res* 111: 967-81.
- 9) Nekohashi M, Ogawa M, Ogihara T, Nakazawa K, Kato H, Misaka T, Abe K, Kobayashi S (2014) Luteolin and quercetin affect the cholesterol absorption mediated by epithelial cholesterol transporter niemann-pick c1-like 1 in caco-2 cells and rats. *PLoS One* 9: e97901.

Study on the inhibition of cholesterol absorption and reverse cholesterol transport by curcumin

Harumi Uto-Kondo

Division of Anti-aging and Vascular Medicine

National Defense Medical College

Reverse cholesterol transport (RCT) is pivotal in the return of excess cholesterol from peripheral tissues to the liver for excretion in bile and eventually feces. RCT from macrophages is a critical anti-atherogenicity mechanism of HDL. Some polyphenols have reported to enhance cholesterol efflux from macrophages. We hypothesized that curcumin might enhance RCT as the anti-atherogenic properties of HDL. First, we investigate whether administration of 0.05% curcumin for 4 weeks to male golden syrian hamsters fed a normal chow diet regulates RCT from macrophages. Effect of curcumin on RCT were assessed by intraperitoneally injecting ^3H -cholesterol-labeled macrophages into hamster, then monitoring appearance of ^3H -tracer in plasma, liver, bile and feces. As a result, curcumin did not increase the levels of ^3H -tracer in them. Recently, we have revealed that the cholesterol absorption inhibitor ezetimibe promoted RCT in hamsters. Several papers reported that curcumin inhibited cholesterol absorption *in vitro*, it remains unclear whether it affects RCT functions. Second, we examined whether administration of 0.05% curcumin for 12 weeks to hamsters fed a high cholesterol diet regulates RCT from macrophages, but curcumin did not increase RCT. Niemann-Pick C1-Like 1 mRNA expression in lumen determined by real time RT-PCR method was not significantly changed in hamster administrated curcumin. Moreover, administration of 0.05% curcumin for 9 weeks has reported to elevate the levels of HDL-C in hamsters fed a high fat high cholesterol diet. We also investigated whether hamsters under the same condition regulate RCT from macrophages, but curcumin did not increase HDL-C and RCT.

In conclusion, curcumin did not affect the inhibition of cholesterol absorption and enhance RCT from the macrophages under the condition of our study.