

## ヒト肝臓培養細胞による茶カテキンの媒介する 新規コレステロール代謝調節系の解明と応用

### 【助成対象者】

岐阜大学応用生物科学部  
シニア教授・教授 長岡 利

### 【共同研究者】

岐阜大学応用生物科学部  
助教 島田 昌也

### 【研究の目的】

高い血漿低密度リポタンパク質 (LDL) レベルは動脈硬化症等のリスクを増大させることが知られている。LDL レベルは主に肝臓で発現している LDL 受容体 (LDLR) により調節されている。我々は、茶に含まれる主要なポリフェノールである Epigallocatechin gallate (EGCG) がヒト培養肝臓細胞 HepG2 において、LDLR mRNA レベルを増加させることを報告した [1] が、その作用メカニズムは未だ不明な点が多い。近年、LDLR タンパク質の分解を促進する因子として Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9) が発見され、血漿 LDL レベルに影響を与える新たな因子として注目を集めている [2]。PCSK9 欠損マウスは動脈硬化を抑制する [3]。これまで PCSK9 に対する EGCG の作用は報告されていない。そこで、本研究では EGCG による LDLR mRNA レベル上昇作用の機構解明及び PCSK9 に対する EGCG の影響などについて、HepG2 細胞を用いて解析することを目的とした。

### 【研究の成果】

#### 【方法】

〈実験 1〉10%牛胎児血清を含む MEM 培地で培養した HepG2 細胞に JNK、ERK、p38 の各シグナル伝達経路の阻害剤及び EGCG を添加して 24 時間培養後、全 RNA を回収して LDLR mRNA、PCSK9 mRNA レベルを Real-time 定量 PCR 法により測定した。また、細胞培地を回収し、PCSK9 タンパク質レベルを ELISA 法により測定した。

〈実験 2〉10%牛胎児血清を含む MEM 培地で培養した HepG2 細胞に EGCG を 3、6、12、18 時間添加した後、全 RNA を回収して PCSK9 mRNA レベルを Real-time 定量 PCR 法により測定した。また、細胞培地を回収し、PCSK9 タンパク質レベルを ELISA 法により測定した。

〈実験 3〉10%牛胎児血清を含む MEM 培地で培養した HepG2 細胞に EGCG、genistein、resveratrol、

quercetin それぞれを 24 時間添加し、全 RNA を回収して LDLR mRNA 及び PCSK9 mRNA レベルを Real-time 定量 PCR 法により測定した。また、細胞培地を回収し、PCSK9 タンパク質レベルを ELISA 法により測定した。

#### 【結果・考察】

〈実験 1〉 EGCG による LDLR mRNA レベル上昇作用は ERK 経路阻害剤により消失した。EGCG は培地の PCSK9 タンパク質レベルを著減させたが、PCSK9 mRNA レベルに減少はなく、阻害剤の影響も見られなかった。

〈実験 2〉 EGCG を 3、6、12、18 時間添加した場合においても、PCSK9 mRNA レベルに減少は見られなかったが、培地の PCSK9 タンパク質は EGCG のすべての添加時間帯で有意に減少した（次ページの図 1 参照）。

〈実験 3〉 すべてのサンプルで、Control と比較して LDLR mRNA レベルの有意な上昇が見られた。培地の PCSK9 タンパク質レベルは EGCG 及び quercetin 添加で有意に減少したが、mRNA レベルの減少は見られなかった（次ページの図 2 参照）。

以上より、EGCG は ERK 経路を介して LDLR mRNA レベルを増加させることを発見した。

さらに、EGCG は培地の PCSK9 タンパク質を早期に著減させることを明らかにした。また、quercetin が EGCG と類似する作用を示すことを新たに発見した。PCSK9 を低下させる成分の探索評価はコレステロール代謝改善作用を発揮する成分の発見に有用である。

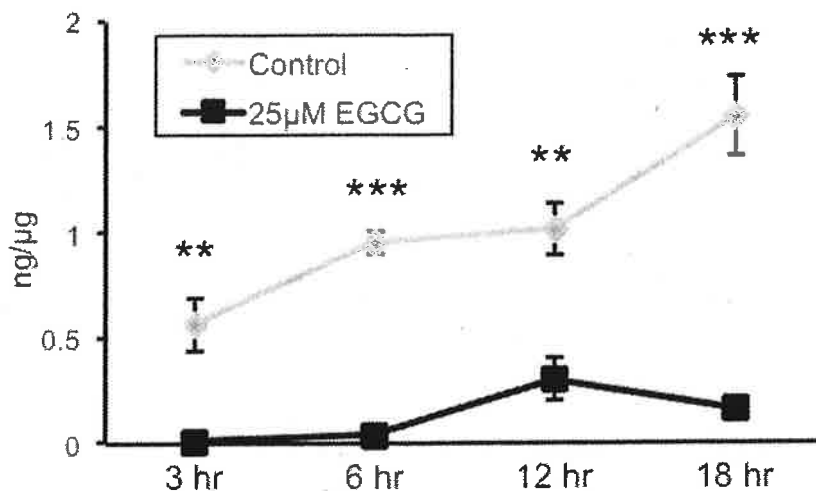


図 1. HepG2 細胞を EGCG で処理した際の細胞外 PCSK9 レベルの時間変化  
(\*\* P < 0.01, \*\*\* P < 0.001; Student's t-test)

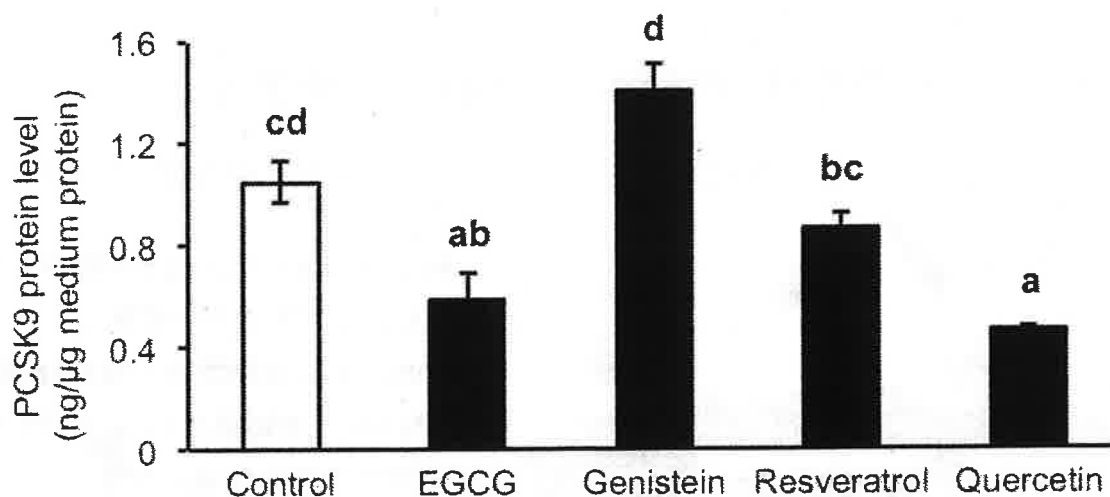


図 2. HepG2 細胞を各種ポリフェノールで 24 時間処理した際の細胞外 PCSK9 レベル  
(p < 0.05; Tukey's test)

【参考論文】

- [1] Goto T., Saito Y., Morikawa K., Kanamaru Y., Nagaoka S., (2012) *Br. J. Nutr.*, 197, 769-773.
- [2] Cohen JC., Boerwinkle E., Mosley TH Jr., Hobbs HH., (2006) *N. Engl. J. Med.*, 354, 1264-1272.
- [3] Denis M., Marcinkiewicz J., Zaid A., Gauthier D., Poirier S., Lazure C., Seidah NG., Prat A., (2012) *Circulation*, 125, 894-901.

【本研究に関する主な発表論文、投稿等】

(学術発表)

[1] 北村幸平, 三嶋周平, 島田昌也, 長岡 利: エピガロカテキンガレートによる LDL 受容体活性化及び PCSK9 減少の分子機構. 日本農芸化学会 2014 年度大会, 2014 年 3 月 28 日 (東京)

[2] 北村幸平, 三嶋周平, 岡田雄大, 島田昌也, 長岡 利: Epigallocatechin gallate は PCSK9 低下を伴って LDL 受容体を活性化する. 第 8 回日本ポリフェノール学会 学術大会, 優秀発表賞 (銀賞) 受賞, 2014 年 8 月 8 日 (東京)

[3] Satoshi Nagaoka\*, Kouhei Kitamura, Syuuhei Mishima, and Masaya Shimada: Epigallocatechin gallate and quercetin induce a suppression of PCSK9 accompanying with an up-regulation of LDL receptor in HepG2 cells.

*Proceedings of the XXVI<sup>th</sup> International Conference on Polyphenols & The 8<sup>th</sup> Tannin Conference*, 41-42 (2014) (Selected for oral presentation), September 2, 2014, Nagoya \*corresponding author