

2021年度 若手・女性研究者奨励金 レポート

研究課題	生死を分ける新たなファクター ー遊離コレステロール/コレステロールエステル比と酸化ストレスー
キーワード	①酸化ストレス、②新たな生体内マーカー、③FC/CE 比

研究者の所属・氏名等

フリガナ 氏名	ナガセ ミドリ 永瀬 翠
配付時の所属先・職位等 (令和3年4月1日現在)	東京工科大学 応用生物学部 助教
現在の所属先・職位等 (令和4年7月1日現在)	東京工科大学 応用生物学部 助教
プロフィール	2015年に東京工科大学大学院バイオ・情報メディア研究科バイオニクス専攻博士前期課程を修了。その後、同大学で実験助手として勤務しながら、2018年に論文博士として博士(工学)の学位を取得し、2019年から同大学の助教として勤務。主な研究テーマは「生体内酸化ストレス」である。これまで、指導教員の共同研究により、実際の患者さんの血漿サンプル中の酸化ストレスマーカーの分析を、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)を用いて行ってきた。そのため、現在はHPLC分析技術を活かしながら、酸化ストレス関連の研究を行っている。

1. 研究の概要

酸化ストレスとは、生体内の酸化反応と還元反応のバランスが、酸化反応に傾くことをいう。酸化ストレスが関与していると言われている病気は多く、多くの研究が行われている。これまで申請者が行ってきた研究から、酸化ストレスが関与していると言われている病態において、遊離コレステロール(FC)とコレステロールエステル(CE)の比(FC/CE比)の増加を確認していた。しかし、酸化ストレス亢進とFC/CE比の増加との関連はこれまで明らかとされていない。これらの関係やメカニズムが解明できれば、酸化ストレスが関与している病態の、新たな臨床マーカーや、治療ターゲットとなると考えられる。

そこで本研究では、*in vitro*で現象として捉えていた、FC/CE比の増加と酸化ストレス亢進の関連を*in vivo*の系で明らかにすることを目標として研究を行った。

2. 研究の動機、目的

これまで研究を行っていく中で、心肺停止後に起こる重篤な症状である心停止後症候群患者では、遊離コレステロール(FC)とコレステロールエステル(CE)の比(FC/CE比)が亡くなる人ほど高いことが示唆された。FCは肝臓で作られるレシチンコレステロールアシルトランスフェラーゼ(LCAT)という酵素によってCEに変換される。そのため、生死を分ける要因として、肝機能の低下、もしくはLCATの活性低下の関与が考えられた。

FC/CE比が高くなるのは、心停止後症候群患者だけではない。酸化ストレスが関与していると言われている、小児線維筋痛症患者においても、健常児より有意にFC/CE比が高いことが明らかとされている(Miyamae T *et al.*, Redox Report, 2013)。心停止後症候群患者でも酸

化ストレスが亢進していたことから、酸化ストレスの亢進と FC/CE 比の関係に興味を持たれた。これまで酸化ストレス亢進と肝機能の低下もしくは、LCAT の活性低下の関連については明らかにされていない。また、生死を分けるファクターとしても FC/CE 比は注目されていない。そのため、これらの関連を明らかにすることができれば、臨床現場における生死を分ける新たなファクターを明らかにすることができると考えた。そこで本研究では、ヒト肝癌由来細胞 (HepG2) を用いて、酸化ストレス亢進と FC/CE 比の増加の関連を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の結果

研究結果については、未発表データを含むため、概要のみ記載する。

本研究ではまず、HepG2 細胞から、リポタンパク質などと一緒に分泌される FC や CE を定量する必要があった。そこで、高速液体クロマトグラフィーを用いて、FC と、血中に多く含まれる CE であるオレイン酸コレステロール (Ch18:1)、リノール酸コレステロール (Ch18:2) や、アラキドン酸コレステロール (Ch20:4) の同時分析法の確立を行った。様々な条件検討を行ったところ、FC と上記 3 つの CE の同時分析法が確立できた。分析法の確立後、細胞上清中に FC や CE を添加して回収率を確認したところ、FC は添加した分の全てが回収できたが、CE は回収できなかった。そこで、細胞上清と CE を混合した容器中で抽出操作を行ったところ、CE が全て回収できた。これは、CE の疎水性が非常に高いため、細胞上清と混合されなかったからであると考えられる。しかし、細胞から CE が分泌される際は、リポタンパク質に含有される形で分泌されるので、実際に細胞から分泌されたものであれば、今回用いた抽出法で CE を抽出することが可能であると考ええる。

細胞上清中の FC と CE の分析法が確立できたため、HepG2 細胞で FC と CE の分泌を誘導し、細胞上清中の FC と各 CE を分析した。FC は、分泌誘導をしていない HepG2 細胞と分泌誘導を行った HepG2 細胞を比較すると、分泌誘導を行った HepG2 細胞で増加が確認できた。しかし、CE は分泌誘導を行った HepG2 細胞で CE だと思われるピークは検出されたが、目的としていた Ch18:1、Ch18:2、Ch20:4 のピークは確認できなかった。そのため、CE の分泌誘導法や、HepG2 細胞で分泌される CE の検討を再度行う必要があることがわかった。

今回の研究期間では、酸化ストレス亢進と FC/CE 比の関連まで明らかにできなかった。しかし、今後この研究を進めていくための方向性や、課題などが明らかとなった。

4. 研究者としてのこれからの展望

これまで指導教員が行っていた共同研究に参加する中で、パーキンソン病、筋萎縮性側索硬化症や、敗血症などの患者さんにおいて、酸化ストレスがどの程度亢進しているかを、血漿中酸化ストレスマーカーや、抗酸化物質を分析することで評価してきました。酸化ストレスは、様々な病気に関与していると言われており、多くの研究が行われています。しかし、酸化ストレスをターゲットとした治療などはほとんど確立されておらず、酸化ストレスマーカーも臨床マーカーとしてあまり用いられていません。多くの病気で酸化ストレスが関与していることから、酸化ストレスがどのような影響を与えるかなど、詳しく明らかにすることができれば、新しい治療のターゲットなどを提唱できる可能性はあると考えています。そのため、酸化ストレスに関する基礎研究を進めることで、社会に貢献できるような研究者になりたいと考えています。

5. 支援者（寄付企業等や社会一般）等へのメッセージ

まず、本研究課題の意義をご理解いただき、2021 年度女性研究者奨励金に採択していただきましたこと、また、奨励金のために寄付していただいた支援者の皆様に感謝申し上げます。この奨励金は、学位を取得してから初めて採択されたこともあり、研究者としてのキャリアの大きな一歩になったと思っております。今回ご支援いただきました奨励金により、これまで資金の関係で着手できずにいた研究を始めることができました。研究を始められたことで、新たな課題なども明らかにすることができ、今度も研究を進め、社会に還元できるよう努めてまいります。今後ともご支援のほど、よろしくお願い申し上げます。