

令和 2 年 5 月 20 日現在

機関番号：20101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K20103

研究課題名(和文)植物フラボノイドクエルセチンの強心作用と分子メカニズムに関する研究

研究課題名(英文) Study of cardiotoxic action of plant-derived flavonoid, quercetin and its molecular mechanism

研究代表者

早水 憲吾 (Hayamizu, Kengo)

札幌医科大学・医学部・研究員

研究者番号：70444833

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：クエルセチンは抗酸化作用を持つ植物フラボノイドで、抗腫瘍作用や心臓血管保護作用を持つことが知られている。その機序は抗酸化作用や抗炎症作用を介しているものと考えられ、クエルセチンが直接的な陽性変力作用を持つという報告は少ない。本研究の目的は、クエルセチンが持つ抗腫瘍作用や心臓血管保護作用とは別の機序で心臓に対する直接的な陽性変力作用を持つことを証明することであった。In vitro, in vivoの実験を行い、それらの結果からクエルセチンとその代謝物がジギタリスに似た作用によりカルシウムトランジェントを増加させることが示唆された。以上の結果を学術誌に報告し、国際学会において発表を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、クエルセチンとその代謝物がこれまでに知られている抗酸化作用や抗炎症作用に加えインピボにおいて強力な強心作用をもつことを証明し、その少なくとも一部はジギタリス様心筋細胞カルシウムトランジェント増強によっていることを証明することができた。これは、クエルセチンが心臓血管疾患に対してこれまで考えられてきたよりさらに有用な効果を持つ可能性を示唆している。心臓血管保護作用を持ちながら、強心作用を持つ薬として心臓血管疾患に対して新たに臨床使用できる可能性を示すことができた。

研究成果の概要(英文)：The plant-derived flavonoid, quercetin (QCT), has many biological actions, including anti-tumor effects and cardioprotective effects, resulting from its antioxidant and anti-inflammatory effects.

In this study, the aim of our study was to find the direct effects of QCT on cardiac function to explore other unknown mechanisms underlying its actions exerted on the cardiovascular system. Our study demonstrated that QCT and its metabolite have a potent cardiotoxic action through the in vivo and in vitro experiment, through digitalis-like enhancement of Calcium transient in cardiomyocytes in addition to antioxidant and anti-inflammatory effects. We presented our findings at the international conference and published in the refereed journal.

研究分野：麻酔科学

キーワード：クエルセチン フラボノイド 強心作用 カルシウムトランジェント

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

クエルセチン(3,3',4',5,7-pentahydroxyflavon)は果物や野菜に含まれる強力な抗酸化作用を持つフラボノイドである。疫学研究により、クエルセチンを多く摂取することによって心血管系に関する疾患の罹患率や致死率が減少することが示されている。インビトロ研究においてはクエルセチンやそれに関連するフラボノイドは活性酸素種を捕捉することで LDL の酸化修飾を抑制することが示されている。クエルセチンは、その抗酸化作用に加えて、生理学および病理学的経路に関わる多くのシグナリング経路に干渉することが報告されている。

ドキソルビシンはアントラサイクリン系抗生物質であり、様々な種類の癌に対して使用されているが、心臓を含む非腫瘍組織に対しては活性酸素種を産生し、ミトコンドリア機能を障害することで重篤な有害作用をもたらすことが一般的に知られている。ドキソルビシンによる心筋細胞への毒性に対し、クエルセチンは抗酸化作用、もしくはカルボニルレダクターゼの抑制、鉄のキレート化、さらには *bmi-1* をアップレギュレーションすることによって保護的作用をもたらすことがいくつかの研究によって示されている。先行研究においてドキソルビシンが単離心筋細胞の収縮を直接減弱させることを見出すことができた。そこでクエルセチンを用いて処理を行うとそのドキソルビシンによる心筋細胞の収縮抑制を減らすことができるのではないかと考え、単離心筋細胞においてドキソルビシンとクエルセチンを用いた実験を行なった。その結果、クエルセチンがドキソルビシンの効果を単に拮抗するだけではなく、更にドキソルビシン処理前のレベルをはるかに超えて収縮を増大させることを見出した。これは、抗酸化作用をはじめとするクエルセチンのこれまでに知られている作用では説明することができなかつたため、クエルセチンには直接的な心血管系の陽性変力作用があるのではないかという仮説を立て本研究を立案した。

### 2. 研究の目的

本研究では、まずクエルセチンとその代謝物の血中濃度と心機能に対する陽性変力作用の関係をインビボにおいて明らかにしたのちに、単一心筋細胞を用いてクエルセチンとその代謝物が心筋細胞内カルシウム動態とサルコメア収縮に及ぼす影響を解析することにより、クエルセチン陽性変力作用の分子メカニズムを明らかにすることを目的とした。

### 3. 研究の方法

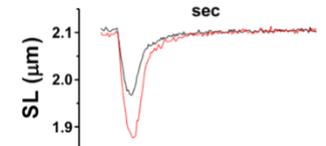
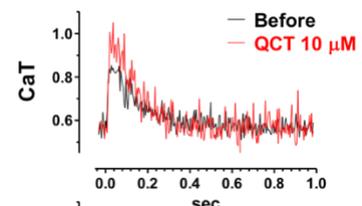
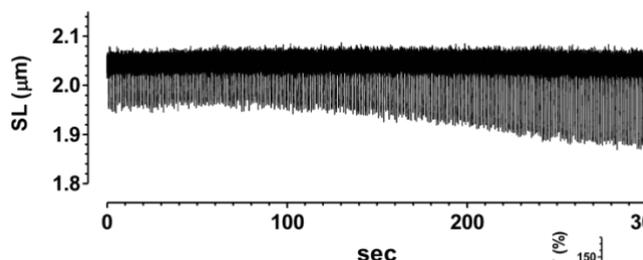
- (1) 心筋細胞の単離とサルコメア短縮、カルシウムトランジェントの同時測定
- (2) 心筋から採取したスキンドファイバーの処理と張力測定
- (3) マウスへのクエルセチン直接投与を行なった後、心エコー検査を行い心機能の測定
- (4) クエルセチンとその代謝産物の血漿濃度の測定
- (5) 心筋トロポニン I の Ser22/23 と他のサルコメアタンパク質のリン酸化の測定

### 4. 研究成果

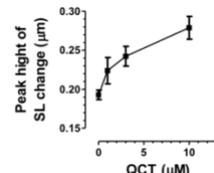
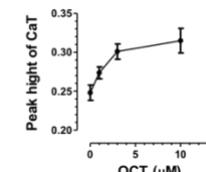
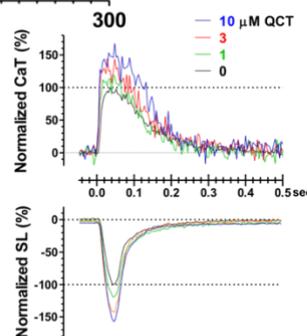
#### (1) インビトロにおけるクエルセチンのサルコメア短縮とカルシウムトランジェントに与える効果

①10  $\mu$ M クエルセチンを溶解したクレブス液で還流しながら単離心筋細胞を 1Hz の間隔で刺激したところ、サルコメア (SL) 短縮の振幅が大きく増大することを証明した。(下図)

また F380 の値からクエルセチンの固有蛍光を減じ補正することによってカルシウムトランジェント (F340/F380) (CaT) はクエルセチンにより著明に上昇していることを明らかにした。(右図)



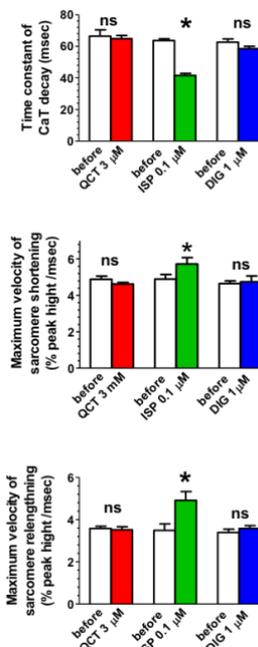
②またクエルセチンはサルコメア (SL) 短縮の振幅とカルシウムトランジェント (CaT) を同様な用量依存性で増大させることが明らかした。(右図左) さらに固有蛍光の影響を受けない Fura2 のみによる F340 の最大値はクエルセチン (QCT) によって用量依存性に増大することを確認した。(右図右)



③ジゴキシンを用いて心筋細胞のカルシウムトランジェントを増大させることにより心収縮能を増大させることを示し、クエルセチンがカルシウムトランジェントの増強によって単離心筋細胞に対して陽性変力作用を与えていることと同様であることを証明した。

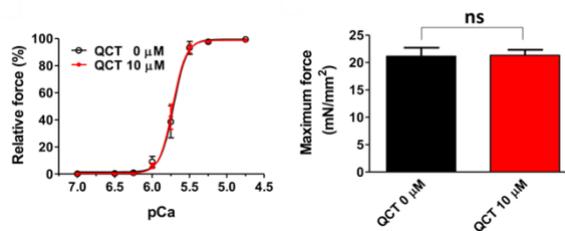
④ウエスタンブロッティングを用いてクエルセチンは cTnI の Ser22/23 (PKA 部位) や他のサルコメアタンパク質のリン酸化に影響を与えないことを示し、クエルセチンの強心作用がβアドレナリン受容体刺激あるいは PDE 阻害作用を通じた cAMP/PKA pathway 活性化による SERCA2a 活性増強といったメカニズムによって引き起こされているものではないことを示した。

⑤心筋細胞を用いてイソプロテレノール (ISP) によるβアドレナリン受容体刺激は cTnI リン酸化レベルの増加、CaT 減衰の時定数 (Time constant of CaT decay) の減少とともに、サルコメア短縮の最大振幅およびサルコメア短縮速度 (Maximum velocity of sarcomere shortening) / 再伸長速度 (Maximum velocity of sarcomere relengthening) の増加として現れる強心作用および弛緩促進作用をもたらしたが、クエルセチンはカルシウムトランジェントとサルコメア短縮のキネティクスには全く影響を与えない事を証明した。(右図) 更にクエルセチンと同様、ジゴキシン (DIG) はサルコメアタンパク質のリン酸化レベルに影響を与えず、カルシウムトランジェントの振幅とサルコメア短縮をキネティクスを変えずに増強させることを証明した。(右図) この結果は、クエルセチンの強心作用が、細胞膜 Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase 阻害により強心作用をもたらすジギタリスと共通したメカニズムによるものである可能性を示唆するものであった。



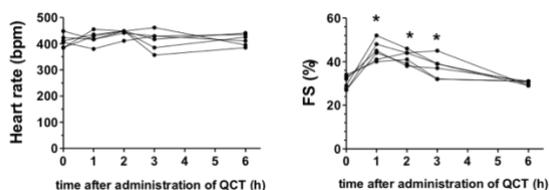
## (2) 心筋スキンドファイバーを用いたインビトロにおけるカルシウムにより誘発されるクエルセチンの張力の効果

クエルセチンが心筋ミオフィラメントに直接作用して強心作用をもたらしているかどうかを確認するため、心筋の細胞膜を透過処理してクエルセチンの効果を検討した。クエルセチンは心筋スキンドファイバーの張力-pCa 関係におけるカルシウム感受性と協同性 (右図 左) と最大張力発生能 (右図 右) には影響を与えないことを証明した。これはクエルセチンが細胞膜を含む細胞内のカルシウムシグナリング機構に影響を与えることで心筋細胞に強心作用をもたらしており、心筋細胞の収縮装置に直接作用して強心作用をもたらしているのではないことを示唆するものであった。

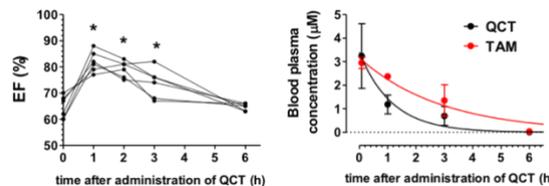


## (3) クエルセチン投与による心収縮能とクエルセチン及びその代謝物の血漿濃度への影響

①クエルセチン (QCT) を野生型マウスに静注し心エコーを行なったところ、左心室駆出率 (EF) と左心室短縮率 (FS) を著明に増加させ、心拍数 (Heart rate) を変化させることなく少なくとも3時間にわたって高い駆出状態が続くことを証明した。(右図)



②HPLC 分析により、クエルセチンとその代謝物の血漿濃度を測定したところ、クエルセチンは速やかに消失する一方で (t<sub>1/2</sub> = 0.80h)、代謝物である 4'-O-methyl QCT (タマリキセチン (TAM)) は静注後少なくとも3時間は高い濃度 (t<sub>1/2</sub> = 2.0h) で維持されることを証明した。(右図 右下) Catechol-O-methyl transferase により産生されることが知られているクエルセチンのもう一つの不溶性代謝物 3'-O-methyl QCT (イソラムネチン) は本研究では検出されなかった。



## (4) インビトロにおけるタマリキセチンのサルコメア短縮とカルシウムトランジェントに与える効果

クエルセチンの代謝物であるタマリキセチンは、単離心筋細胞に対してクエルセチンと同様にカルシウムトランジェント減衰の時定数、サルコメア短縮の最大速度、サルコメア再伸長の最大速度を変化させることなく、カルシウムトランジェントの振幅を著明に増加させることによって強心作用をもたらすことを証明した。クエルセチン静脈内投与後にみられる長時間持続する強心作用において、タマリキセチンが重要な役割を果たしていることを強く示唆するものであ

った。

以上の研究結果より抗炎症作用や抗酸化作用に基づくクエルセチンの生物学的活性に加え、本研究からクエルセチンが心筋細胞に直接作用し、カルシウムトランジェントを増大させることで作用する強心薬であるということが明らかになった。

本研究はクエルセチンとその代謝物タマリキセチン(4'-O-methyl QCT) がインビトロとインビボにおいて強心作用をもつことを証明した初めての研究結果となった。スキンドファイバーの実験において、最大張力発生能とカルシウム感受性や協同性にクエルセチンは影響を与えなかった。このことは、カルシウムセンシタイダーであるピモベンダンやミオシinakチペーターであるメカルビルとは異なり、クエルセチンは心筋細胞の収縮装置に直接影響を与えるものではないことを示している。

本研究において、心筋細胞のQCT処理はPKAによるリン酸化部位であるcTnI Ser22/23のリン酸化レベルを変えず、またPDE抑制によってもたらされることが知られている弛緩促進効果をもたらさなかった。このことは、心筋細胞に対するクエルセチンの強心作用において、PDE阻害を通じたcAMP/PKA経路の活性化は重要な役割を果たしていないことを強く示唆している。

さらに選択的β受容体アゴニストであるイソプロテレノールは単離心筋細胞のカルシウムトランジェント減衰の時定数とサルコメア短縮および再伸長の最大速度を増加させることが示された。また、クエルセチンは単離心筋細胞のカルシウムトランジェント減衰の時定数とサルコメア短縮／再伸長の最大速度には影響を与えなかった。このことは、クエルセチンの心筋細胞に対する強心作用において、SERCA2a活性の修飾は重要な役割を果たしていないことを強く示唆している。

ジギタリスは細胞膜のNa<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPaseを抑制し、それに引き続き細胞内のナトリウム濃度が上昇し、ナトリウム濃度勾配により駆動するNa/Ca交換体によるカルシウム排出が減少させることでカルシウムトランジェントを変化させ、強心作用を発揮する。インビトロの実験において、クエルセチンはジギタリスで報告されたものとは別の経路でNa<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPaseを抑制することが示されている。我々の研究において、うっ血性心不全の治療に用いられるジギタリス由来のジゴキシンはクエルセチンと同様にカルシウムトランジェントの最大振幅を増加させたが、その一方で最大短縮速度と最大再伸長速度に影響を与えなかった。これは、クエルセチンとジゴキシンの強心作用をもたらす機序には類似した分子メカニズムが存在することを示唆している。

インビボの研究においては強心作用を示したわけだが、その実験においては高濃度のクエルセチンを微量、静注することで血漿中のクエルセチン濃度は単離心筋細胞で有意な強心作用がみられる1μMを超えていた。投与したクエルセチンは速やかに代謝され、静注後5分後にはかなりの割合で同等の強心作用をもつタマリキセチンへと代謝されていた。クエルセチンは血小板中のCOMTにより代謝されタマリキセチンへと変化することが示されている。タマリキセチンの血漿濃度が減少する時間経過と、EFやFSがベースラインまで戻る時間経過は類似しており、クエルセチンを静注した後の心収縮能の増加にタマリキセチンが重要な役割を担っていることが示唆された。

本研究は、クエルセチンとその代謝物であるタマリキセチンがこれまでに知られている抗酸化作用や抗炎症作用に加えインビボにおける強力な強心作用をもつことを証明し、その少なくとも一部はジギタリス様心筋細胞カルシウムトランジェント増強によっていることを示唆している。これは、クエルセチンが心臓血管疾患の治療に対してこれまで考えられてきたよりさらに有用である可能性を強く示唆するものであった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Hayamizu Kengo, Morimoto Sachio, Nonaka Miki, Hoka Sumio, Sasaguri Toshiyuki	4. 巻 637
2. 論文標題 Cardiotonic actions of quercetin and its metabolite tamarixetin through a digitalis-like enhancement of Ca <sup>2+</sup> transients	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Archives of Biochemistry and Biophysics	6. 最初と最後の頁 40~47
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.abb.2017.11.009	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Kengo Hayamizu, Miki Nonaka, Sachio Morimoto
2. 発表標題 Cardiotonic actions of quercetin and its metabolite tamarixetin through a digitalis-like enhancement of Ca <sup>2+</sup> transients
3. 学会等名 Biophysical Society 62nd Annual Meeting（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kengo Hayamizu, Sachio Morimoto, Toshiyuki Sasaguri, Sumio Hoka
2. 発表標題 Cardiotonic actions of quercetin, through enhancement of Ca <sup>2+</sup> transient
3. 学会等名 Anesthesiology annual meeting（国際学会）
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

6. 研究組織

氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
---------------------------	-----------------------	----