

平成22年5月27日現在

研究種目： 若手研究 (B)
研究期間： 2008 ~ 2009
課題番号： 20700592
研究課題名 (和文)
フラボノイドによる血管内皮細胞に対する単球接着作用に関する研究
研究課題名 (英文)
Inhibitory effect of flavonoids on monocyte adhesion to endothelial cells
研究代表者
谷 真理子 (TANI MARIKO)
お茶の水女子大学・生活環境教育研究センター・研究機関研究員
研究者番号： 90452028

研究成果の概要 (和文)：

柑橘類に主に含まれるフラボノイドは、血管内皮細胞のNF κ Bの不活性化を介して接着分子発現を低下させ、単球の血管内皮細胞に対する接着を有意に抑制した。さらに、ホモシステインを刺激した単球において、活性酸素産生量、抗酸化酵素および炎症性サイトカイン発現、内皮細胞への接着作用は、フラボノイド処理によって抑制された。従って、フラボノイドは、血管内皮細胞および単球のいずれにおいても活性化を抑制し、動脈硬化症の初期段階に重要な単球の血管内皮への接着を抑制する可能性が示唆された。

研究成果の概要 (英文)：

Citrus flavonoids such as eriodictyol and hesperetin inhibited monocyte adhesion to endothelial cells via suppressing adhesion molecules by NF κ B inactivation. Homocysteine-induced ROS production, expression of anti-oxidant enzyme and inflammatory cytokine, and adhesion to endothelial cells were decreased by citrus flavonoids in monocyte. Citrus flavonoids inhibited the activation of endothelial cells and monocyte, suggesting that their inhibitory effect may contribute to protect against vascular inflammatory.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009年度	1,600,000	480,000	2,080,000
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：生活科学・食生活学

キーワード：健康と食生活、フラボノイド、動脈硬化、単球接着

1. 研究開始当初の背景

これまで、冠動脈疾患と LDL コレステロールの強い相関関係が報告されたことから、冠危険因子として脂質代謝異常が非常に注目されてきた。しかし、近年、脂質代謝異常を伴わない冠動脈疾患の存在が明らかとなり、脂質代謝異常に先行して炎症反応が起こっている場合にも動脈硬化症の進展することが示されている。

動脈硬化症の初期には、炎症性サイトカインなどの刺激により、単球や血管内皮細胞上にセレクチンが発現し、血管内皮表面をローリングする。さらに、血管内皮表面の VCAM-1・ICAM-1 との強力な接着が起こり、内皮下へ遊走、マクロファージに分化する。マクロファージは、動脈硬化惹起性リポ蛋白である酸化 LDL やレムナントリポ蛋白を取り込んで泡沫細胞化し、動脈硬化巣を形成する。

従って、動脈硬化症の初期段階に起こる単球の血管内皮細胞に対する接着現象は非常に重要である。実際に、冠動脈疾患において単球が活性化していることや、高脂血症モデルウサギやヒトの動脈硬化巣で接着分子の発現が報告されている。

以上のことから、血管内皮への単球接着を制御することは、動脈硬化症の予防において非常に有効である。

一方、冠動脈疾患と負の相関を示す代表的な食事因子にフラボノイドがあげられる。申請者は、野菜や果物などの植物に含まれるフラボノイドが LDL に対して抗酸化作用を持つことを示し、食品由来因子による動脈硬化予防の可能性を見出してきた。炎症シグナルは酸化ストレスシグナルと重複する経路である事が多く、抗酸化作用をもつフラボノイドが抗炎症作用を示し、単球の血管内皮細胞に対する接着を抑制する可能性は十分に期待できる。しかし、血管内皮細胞の活性化をフラボノイドが抑制する機序はいまだ解明されていない部分も多く、単球の活性化に対するフラボノイドの作用やその機序についてはほとんど検討されていない。

2. 研究の目的

本研究は、動脈硬化予防に寄与する食品成分としてフラボノイドに着目し、動脈硬化症発症の重要な過程である血管内皮細胞及び単球の活性化に及ぼすレモンフラボノイドの影響について検討を行った。

3. 研究の方法

(1) 血管内皮細胞の活性化に対するフラボ

ノイドの影響

血管内皮細胞にフラボノイドを前処理し、炎症性サイトカインによる単球の血管内皮細胞への接着現象を末梢血管での血流を想定した速度下で検討した。

フラボノイドには、近年、冠動脈疾患罹患率と負の相関が報告されている柑橘類に主に含まれるフラボノイド (eriodictyol, hesperetin) を用いた。

ヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) に、炎症性サイトカインである TNF α と eriodictyol あるいは hesperetin を添加し、6 時間培養した。その後、平行プレートを用いたフローチャンバーを用いて、シエラストレス 1.0 dyne/cm² の流速下でヒト単球系細胞株

(THP-1) の HUVEC に対する接着現象を検討した。その画像をビデオに録画し、ローリングしている細胞数と接着細胞数を計測した。また、そのときの HUVEC における接着分子 ICAM-1 (Intracellular adhesion molecule-1)、VCAM-1 (Vascular cellular adhesion molecule-1) 発現、レドックス感受性転写因子 NF κ B の活性を Western blotting 法にて検討した。

(2) 単球の活性化に対するフラボノイドの影響

動脈硬化の危険因子の一つとして、高濃度のホモシステイン (Hcy) による単球の活性化に注目し、フラボノイド (eriodictyol, hesperetin) による抑制作用を検討した。

Hcy とフラボノイドを刺激した THP-1 細胞またはヒト末梢血単核球に蛍光試薬 DCFH-DA を処理し、活性酸素種 (ROS) 産生量をフローサイトメトリーにて解析した。さらに、細胞内の ROS 産生源の一つとして知られている NADPH オキシダーゼの活性を、Western blotting 法にて検討した。また、抗酸化酵素 (カタラーゼ、グルタチオンペルオキシダーゼ) の発現をリアルタイム PCR 法にて測定した。

活性化した単球からは、炎症性サイトカインの発現が亢進する事が知られている。Hcy とフラボノイドで刺激した THP-1 細胞における TNF α 、IL-1 β 、MCP-1 の発現をリアルタイム PCR 法にて測定した。

次に、Hcy およびフラボノイドを THP-1 細胞に刺激後、HUVEC に対する接着実験を行った。

4. 研究成果

(1) フラボノイドによる血管内皮活性化抑

制作用

炎症性サイトカイン TNF α による THP-1 細胞の血管内皮細胞に対する接着亢進作用は、eriodictyol (TNF α : 13.7 \pm 0.9 cells/HPF; TNF α + 50 μ M eriodictyol: 10.2 \pm 0.8 cells/HPF, p<0.05)、hesperetin (TNF α : 23.9 \pm 1.7 cells/HPF; TNF α + 10 μ M hesperetin: 17.7 \pm 1.0 cells/HPF, p<0.05) 添加により有意に抑制された。また、TNF α によって誘導される血管内皮細胞上の ICAM-1、VCAM-1 の発現レベルは eriodictyol、hesperetin によって抑制された。さらに、eriodictyol および hesperetin により I κ B の分解は阻害されたことから、NF κ B の活性化抑制も示された。

以上の結果より、eriodictyol ならびに hesperetin は、NF κ B の活性化を阻害し、接着分子の発現を低下させることで、単球の血管内皮細胞に対する接着を抑制する事が示唆された。

(2) フラボノイドによる単球活性化抑制作用

ヒト単球系細胞株 (THP-1) における活性酸素量を、フローサイトメーターを用いて測定したところ、Hcy 処理により増加した活性酸素量は、eriodictyol、hesperetin 添加により低下が認められた。また、NADPH オキシダーゼ p67phox と Rac1 の活性阻害が示された。

さらに、抗酸化関連酵素と炎症性サイトカインの発現量を real-time PCR 法にて解析したところ、eriodictyol、hesperetin により Hcy によって誘導されるカタラーゼ、グルタチオンペルオキシダーゼの発現は有意に減少した。また、炎症性サイトカインである MCP-1、TNF- α 、IL-1 β の発現の低下も認められた。

次に、Hcy とフラボノイドを処理した THP-1 細胞を用いて、HUVEC に対する接着実験を行ったところ、Hcy による接着は eriodictyol 添加で 86.1%、hesperetin 添加で 82.5% と有意に減少した (p<0.05)。

以上の結果より、高濃度の Hcy は単球の活性化を惹起させたが、eriodictyol ならびに hesperetin 処理により、NADPH オキシダーゼの活性阻害による ROS 産生低下、抗酸化酵素発現亢進、炎症性サイトカインの発現低下作用を示し、血管内皮細胞に対する接着作用も有意に抑制された。

(1)、(2) の結果より、eriodictyol や hesperetin のようなフラボノイドは、血管内皮および単球のいずれにおいても活性化を抑制し、動脈硬化症の初期段階に重要な単球の血管内皮への接着を抑制する可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 12 件)

1. 岸本良美、谷真理子、近藤和雄：医療における機能性食品 ケミカルエンジニアリング, 55(4): 23-28, 2010 査読なし
2. Kamiyama M, Kishimoto Y, Tani M, Andoh K, Utsunomiya K and Kondo K: Inhibition of low-density lipoprotein oxidation by Nagano purple grape (*Vitis vinifera* × *Vitis labrusca*). *J Nutr Sci Vitaminol*. 55(6):471-8, 2009 査読有
3. Kishimoto Y, Tani M, Uto-Kondo H, Iizuka M, Saita E, Sone H, Kurata H and Kondo K: Astaxanthin suppresses scavenger receptor expression and matrix metalloproteinase activity in macrophages. *Eur J Nutr*. 49(2):119-126, 2010 査読有
4. Kishimoto Y, Tani M, Uto-Kondo H, Saita E, Iizuka M, Sone H, Yokota K and Kondo K: Effects of magnesium on postprandial serum lipid responses in healthy human subjects. *Br J Nutr*. 27:469-472, 2010 査読有
5. Kamiyama M, Kishimoto Y, Tani M, Utsunomiya K, Kondo K: Effects of equol on oxidized low-density lipoprotein-induced apoptosis in endothelial cells. *J Atheroscler Thromb*. ; 16(3): 239-49, 2009 査読有
6. 谷真理子、近藤和雄：「高血圧治療ガイドライン 2009 の概要」 *New Diet Therapy*; 25(1): 1-8, 2009 査読なし
7. 谷真理子、近藤和雄：カルシウム摂取と循環器疾患 *全薬ジャーナル*; 242: 12-15, 2009 査読なし
8. 神山真澄、岸本良美、谷真理子、宇都宮一典、近藤和雄：味噌の熟成過程における大豆イソフラボンの変動と血管内皮障害における影響 *機能性食品と薬理栄養*; 5(3): 167-174, 2008 査読有
9. Kawakami A, Osaka M, Tani M, Azuma H, Sacks FM, Shimokado K, Yoshida M: Apolipoprotein CIII links hyperlipidemia with vascular endothelial cell dysfunction *Circulation* ;118 (7): 731-742, 2008 査読有
10. 岸本良美、谷真理子、近藤和雄：食後高脂血症と機能性食品 *機能性食品と薬理栄養*; 5(3): 129-133, 2008 査読なし

- し
11. 谷真理子、吉田雅幸：白血球-血管内皮相互作用に対する機能性食品の応用 *Functional food*; 2(2): 161-164, 2008 査読なし
 12. 谷真理子、近藤和雄：糖尿病に見られる各種病態：2-(2)遊離脂肪酸とインスリン *日本臨床増刊号 新時代の糖尿病学2*; 45-48, 2008 査読なし

〔学会発表〕(計 18 件)

【国際学会における発表】

1. Tani M, Kondo K (他 13 名) : Effect of lychee polyphenol on postprandial serum lipid responses in healthy human subjects: 16th International Symposium of AHCC Research Association: Sapporo, Japan: 2009
2. Tani M, Kondo K (他 9 名) : Lemon flavonoids reduce homocysteine-induced monocyte inflammation: The 15th International Symposium on Atherosclerosis : Boston, USA : June : 2009
3. Tani M, Kondo K (他 12 名) : Lychee polyphenol inhibit LDL oxidation and adhesion molecule expression in human endothelial cells: The 15th International Symposium on Atherosclerosis : Boston, USA : June : 2009

【国内学会における発表】

4. 谷真理子、岸本 良美、飯塚 麻貴、才田 恵美、吉田 雅幸、近藤 和雄：脂肪摂取後の白血球の活性化に対するレスベラトロールの影響：第 64 回日本栄養・食糧学会大会：徳島：2010：5 月
5. 谷真理子、近藤 和雄 (他 10 名)：ホモシステインによる単球の炎症反応に対するレモンフラボノイドの影響：第 31 回日本臨床栄養学会総会・第 30 回日本臨床栄養協会総会：神戸：2009：9 月 若手奨励賞受賞
6. 谷真理子、近藤和雄 (他 10 名)：レモンフラボノイドの動脈硬化予防作用：第 3 回ポリフェノール研究会：東京：2009：8 月
7. 谷真理子、近藤 和雄 (他 10 名)：レモンフラボノイドがホモシステイン刺激による単球の炎症に及ぼす影響：第 63 回日本栄養・食糧学会大会：長崎：2009：5 月
8. 谷真理子、近藤和雄 (他 10 名)：レモンフラボノイドの単球活性化に及ぼす影響：第 6 回日本機能性食品医用学会：0-II-1:兵庫：2008：12 月

9. 谷真理子、近藤 和雄 (他 11 名)：レモンフラボノイドがホモシステインによる単球活性化に及ぼす影響：第 30 回日本臨床栄養学会総会・第 29 回日本臨床栄養協会総会：0-061: 東京：2008：10 月
10. 谷真理子、吉田 雅幸、近藤 和雄 (他 9 名)：レモンフラボノイドによる血管内皮細胞への単球接着抑制作用：第 62 回日本栄養・食糧学会大会：2F-10p: 埼玉：2008：5 月

◆シンポジウム講演

11. 谷真理子：柑橘類の抗動脈硬化作用：第 7 回日本機能性食品医用学会総会シンポジウム：広島：2009：12 月
12. 谷真理子：生薬による LDL 酸化抑制に関する検討：第 8 回日本臨床中薬学会学術大会：埼玉：2008：9 月

◆国内学会 ポスター発表

13. 谷真理子、近藤 和雄 (他 10 名)：ホモシステインによる単球の活性化に対するレモンフラボノイドの影響：第 16 回日本未病システム学会学術総会：大阪：2009：11 月
14. 谷真理子、近藤 和雄 (他 10 名)：レモンフラボノイドはホモシステインによる単球の炎症反応を抑制する：第 30 回日本肥満学会：浜松：2009：10 月
15. 谷真理子、近藤 和雄 (他 10 名)：Effect of lemon flavonoids on homocysteine-induced monocyte : 第 41 回日本動脈硬化学会：山口：2009：7 月
16. 谷真理子、近藤和雄 (他 10 名)：ホモシステインによる単球活性化に対するレモンフラボノイドの影響：第 15 回日本未病システム学会：A-03: 東京：2008：11 月
17. 谷真理子、吉田雅幸、近藤和雄 (他 9 名)：レモンフラボノイドの血管内皮細胞に対する単球接着抑制作用：第 29 回日本肥満学会：P-139: 大分：2008：10 月
18. 谷真理子、吉田雅幸、近藤和雄 (他 9 名)：Lemon Flavonoids Attenuates TNF α -induced Monocyte Adhesion to Vascular Endothelium under Flow Condition: 第 40 回日本動脈硬化学会：3: 筑波：2008：7 月

[その他]
ホームページ等
<http://island.geocities.jp/kondolabocha/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

谷 真理子 (TANI MARIKO)
お茶の水女子大学・生活環境教育研究センター・研究機関研究員
研究者番号：90452028

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

吉田 雅幸 (Masayuki Yoshida)
東京医科歯科大学・生命倫理研究センター・教授
研究者番号：80282771