

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 23 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22580130

研究課題名（和文） 血管新生抑制作用を有する食品機能成分の多機能性の解明と応用研究

研究課題名（英文） Study on the mechanism of multi-function of food-derived anti-angiogenic compounds and their application

研究代表者

松原 主典 (MATSUBARA KIMINORI)

広島大学・大学院教育学研究科・准教授

研究者番号：90254565

研究成果の概要（和文）：

ヒトの健康に役立つ効果が示されている食品機能成分に共通する生理機能として血管新生抑制作用がある。また、血管新生抑制作用を有する食品機能成分は多彩な生理作用を示す。本研究では、その多機能性を示す作用機構について分子レベルで検討をした。その結果、遺伝子発現・細胞情報伝達系・オートファジーに影響を与えることが多機能性と関連していることを明らかにした。また、経口摂取によっても老化に伴う脳機能の低下に対して保護作用があることを動物実験モデルで示した。

研究成果の概要（英文）：

It has been demonstrated that antiangiogenic activity is a common biological activity of food-derived bioactive compounds that are useful for human health. In this study, the molecular mechanisms how such compounds exert various useful effects on human health were investigated. Consequently, it has been revealed that the compounds affect gene expression, cell signaling pathways, and autophagy. Oral administration of the compound prevents brain function in animal aging model.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2012年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・食品科学

キーワード：血管新生、多機能性、血管内皮細胞、神経細胞、脳、オートファジー

1. 研究開始当初の背景

血管新生とは、既存の血管から新しい血管が生じる現象であり、がんの成長・転移、糖尿病性網膜症、動脈硬化、肥満など様々な病態悪化と密接に関連している。近年、アルツハイマー型認知症といった脳疾患でも血管新生が亢進していることが明らかとなっている。興味深いことに、茶・ワイン・大豆・

海藻等に含まれるポリフェノール・カロテノイド類、魚油の多価不飽和脂肪酸、ビタミン類など、健康維持に有益だと考えられている食品成分の多くに共通する生理機能が血管新生抑制作用であることが世界中の研究者によって明らかにされてきている。また、これら血管新生抑制作用を有する機能成分は、抗炎症作用・抗アレルギー作用・がん細胞増

殖抑制作用など多彩な生理作用を有していることが報告されている。注目すべきことに、抗炎症薬剤・コレステロール合成阻害薬剤・降圧薬剤の服用によって脳疾患やがん発生のリスクが低下することが報告され、これらの薬剤に共通する生理作用である血管新生抑制作用が関与していることが指摘されている。

一方、健康維持に役立つ食品成分や薬剤に共通した機能が、なぜ血管新生抑制作用なのかという疑問については明確になっておらず、食品機能分野だけではなく医薬分野でも研究が進められている。更に、血管新生抑制作用を有する食品成分が多彩な生理作用を示す詳細なメカニズムについても不明なままである。従って、その作用機構を明らかにすることに興味を持たれていた。

また、血管新生抑制作用を持つ食品機能成分の新規機能にも高い関心が寄せられている。なかでも、高齢化社会を迎えた現在、高齢者の健康寿命を延ばし、支援や介護への移行を遅らせることができる、脳機能保護効果に関心が寄せられている。

2. 研究の目的

本研究では、血管新生抑制作用を有する食品成分が血管内皮細胞に与える影響を遺伝子レベルで網羅的に解析した結果をもとに、多彩な生理機能の作用機構を明らかにすることを目的とした。さらに、その応用研究として、脳機能保護効果について検討した。

3. 研究の方法

複数の血管新生抑制作用を持つ食品機能成分の遺伝子発現への影響についてはDNAマイクロアレイ解析法により検討した。データ処理によって選択された各遺伝子の機能解析はsiRNA法と細胞実験で検討した。さらに、脳機能保護効果については、神経細胞モデルとしてSH-SY5Y細胞を用いてin vitro系で評価した。加えて、in vivoモデルとして老化促進マウス(senescence-accelerated mouse; SAM)を用い、経口投与による脳機能保護効果を行動科学実験と組織化学実験で検討した。

4. 研究成果

血管新生抑制作用を持つ食品機能成分を血管内皮細胞に暴露し、回収したmRNAからcDNAを合成し、DNAマイクロアレイ解析を行った。共通して変動する遺伝子を複数選び、血管内皮細胞でのsiRNA法で血管新生への影響を検討した。その結果、血管新生に対しては明確な影響は見られなかった。しかしながら、細胞の代謝に関連する遺伝子を誘導する

ことが分かった。そこで、より詳細な作用機構を検討するため、機能成分をローズマリーに含まれるカルノシン酸(CA)に絞り解析を続けた。

カルノシン酸の細胞への影響として、keap1-Nrf2系を介する酸化ストレスに対する保護効果が知られているが、代謝系に影響を与えることから、低栄養(飢餓)に対する保護効果も予想された。そこで、SH-SY5Y細胞を用いて、飢餓(Hanks' Balanced Salt Solution)と酸化ストレス(過酸化水素)に対する保護効果を検討した。その結果、カルノシン酸は飢餓に対しても保護効果を示すことが明らかとなった(図1)。

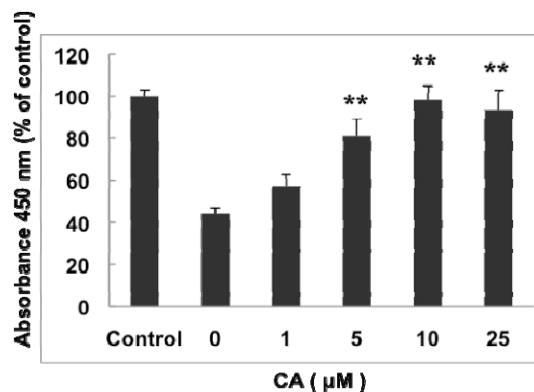


図1 カルノシン酸の飢餓に対する保護作用

そこで、その作用機構についてさらに検討を進めた。カルノシン酸は他細胞の研究において、主要な細胞内情報伝達系ErkとAktを活性化することが報告されていたことから、両情報伝達系への影響を検討したところ、SH-SY5Y細胞でも同様にErkとAktのリン酸化が促進されることを見出した(図2)。

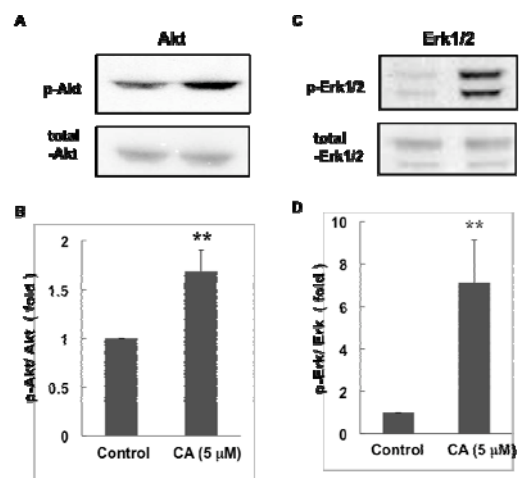


図2 カルノシン酸のAkt及びErkのリン酸化促進

このように、細胞の飢餓に対する保護効果があることから、細胞が飢餓状態になると活性化するオートファジーを活性化することが考えられ、その可能性についても検討した。その結果、カルノシン酸はオートファジーを活性化することが明らかとなった（図3）。

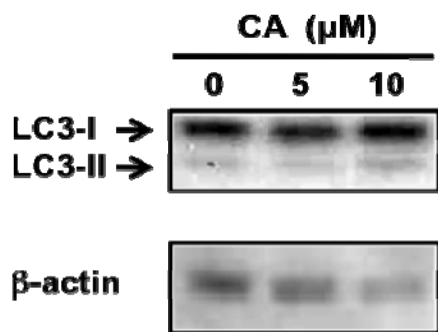


図3 カルノシン酸によるオートファジーの活性化

従って、カルノシン酸の細胞保護作用は、主要な細胞内情報伝達系である Erk と Akt のリン酸化促進とオートファジー活性化が関与していることが明らかとなった。特に、カルノシン酸のオートファジー活性化は、カルノシン酸の機能性を考える上で極めて興味深い作用である。

カルノシン酸が血管新生を抑制し、さらにオートファジーを活性化させることにより細胞内の代謝系も変化させることが判明したことから、様々な疾病予防に異常な血管新生に対する抑制効果と細胞内の異常タンパク質の除去などに働くオートファジー活性化が大きな役割を果たしていることが明らかとなった。他の血管新生抑制作用を持つ食品機能成分についても同様な作用機構が多様な生理機能と関連していることが示唆された。そこで、いくつかの成分についても検討したところ、同様にオートファジー活性化作用を確認できた。オートファジーも多くの疾病との関連が明らかになっていることから、血管新生抑制作用とオートファジー活性化作用の両作用を持つ食品機能成分を摂取することが、ヒトの疾病のリスクを下げることに繋がっていると考えられる。

高齢化社会を迎えた現在、加齢に伴う脳疾患のリスク低下させる食品機能成分が期待されている。カルノシン酸については、そのような効果が期待できることから、経口摂取による脳機能保護効果について老化促進マウスを用いて検討した。カルノシン酸を含むローズマリー抽出液と純粋なカルノシン酸を一定期間 SAM に経口摂取させ、Morris 水迷路試験や新奇物質認識試験を行い行動科学的に評価した。さらに、脳について組織化学的に検討をした。

的に評価した。さらに、脳について組織化学的に検討をした。

ローズマリー抽出液の経口投与では、老化初期の行動科学的評価で有効性が示唆されたが、その後は明確な有効性は確認できなかった。一方、純粋なカルノシン酸を投与した SAM では Morris 水迷路試験で明確な有効性が示された。つまり、カルノシン酸を摂取している SAM はコントロール群よりも明らかに短時間で避難台に到達することができた（図4）。

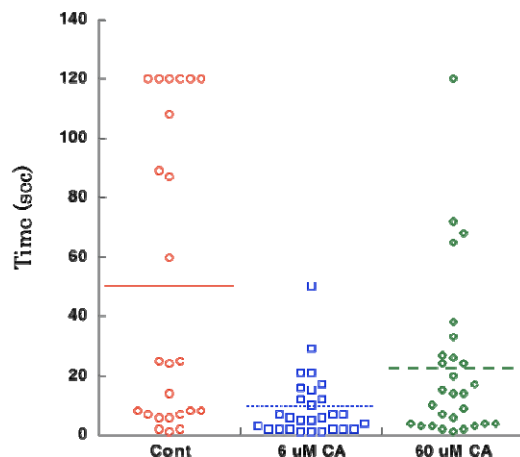


図4 カルノシン酸摂取による脳機能保護作用（Morris 水迷路試験）

この結果は、カルノシン酸の経口摂取によって SAM の脳機能が保護されたことを示すものである。そこで、脳を取り出して、脳の状態について組織化学的に検討した。その結果、海馬・歯状回においてカルノシン酸を摂取していないコントロールマウスでは神経細胞死が多くみられたが、カルノシン酸摂取マウスでは明らかに死細胞が少なかった。つまり、カルノシン酸は経口摂取によっても脳神経細胞死を抑制し、脳機能に対して保護的に働くことが示された（図5）。

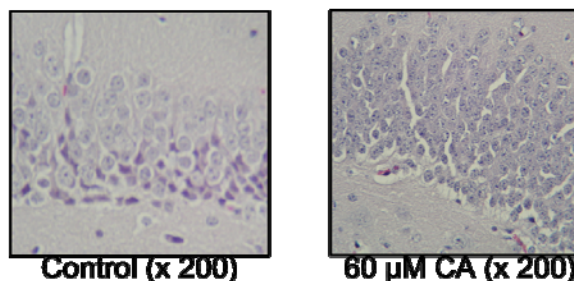


図5 カルノシン酸摂取による脳神経細胞死抑制

以上の結果から、血管新生抑制作用を持つ食品機能成分の多彩な生理機能には、細胞情報伝達系への影響やオートファジー活性化が関与していることを明らかにすることができた。また、両作用を持つカルノシン酸について、経口摂取による脳機能保護効果を検討したところ、有効に作用することが示された。従って、血管新生抑制作用とオートファジー活性化作用を持つ食品機能成分は、高齢化社会における認知症予防などに応用でき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3件)

1. Tomoko Kayashima, Kiminori Matsubara, Antiangiogenic effect of carnosic acid and carnosol, neuroprotective compounds in rosemary leaves. Biosci. Biotechnol. Biochem., 76, 115-119, 2012. (査読有)
2. 松原主典, 血管新生抑制作用を有する食品機能成分の多機能性, 化学工業, 63, 1-5, 2012. (査読無)
3. 松原主典, ローズマリー成分カルノシン酸の血管新生抑制作用と皮膚保護作用, AROMA RESEARCH, 13, 319-322, 2012. (査読有)

[学会発表] (計6件)

1. 柴田紗知, 丸橋里紗, 萱島知子, 松原主典, カルノシン酸の神経細胞保護作用機構と経口摂取による効果の検討, 日本家政学会第65回大会, 2013年5月17日~19日, 東京
2. 柴田紗知, 萱島知子, 松原主典, カルノシン酸及びスルフォラフアンの神経細胞保護作用機序, 日本農芸化学会2013年度(平成25年度)大会, 2013年3月24日~27日, 仙台
3. 柴田紗知, 萱島知子, 松原主典, ローズマリー成分カルノシン酸の神経細胞保護作用とその作用機序, 日本農芸化学会中四国支部第34回講演会(支部大会), 2012年9月21日~22日, 宇部
4. 柴田紗知, 松原主典, 萱島知子, ローズマリー成分カルノシン酸による神経細胞保護作用, 日本家政学会第64回大会, 2012年5月11日~13日, 大阪
5. Ganesan, P., 松原主典, 菅原達也, 平田孝, 海藻カロテノイドによる血管新生抑制作用の分子機構, 日本農芸化学会2012年度(平成24年度)大会, 2012年3月23日~26日, 京都
6. Kayashima Tomoko, Sachi Shibata,

Kiminori Matsubara, Antiangiogenic effect of carnosic acid and carnosol, neuroprotective compounds in rosemary leaves. 14-17 Nov 2011, Sapporo (Japan)

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松原 主典 (MATSUBARA KIMINORI)

広島大学・大学院教育学研究科・准教授

研究者番号：90254565

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：