

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 11 日現在

機関番号：82111

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23500996

研究課題名(和文) リンゴ果実プロシアニジン類の動脈硬化予防とその作用機構の解明

研究課題名(英文) Prevention of atherosclerosis by apple procyanidins and elucidation of their mechanism

研究代表者

庄司 俊彦 (SHOJI, Toshihiko)

独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構・果樹研究所 栽培・流通利用研究領域・主任研究員

研究者番号：90582510

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円、(間接経費) 1,050,000円

研究成果の概要(和文)：リンゴに含まれるポリフェノールで主要な機能性成分であるプロシアニジン類(APC)の動脈硬化予防作用を検討するため、ApoE欠損動脈硬化マウスや培養細胞で検討した。ApoE欠損マウスに高脂肪食を20週間摂取させると普通食に比べ著しい体重増加や内臓脂肪が蓄積し、静脈において血栓様構造が認められた。一方、高脂肪と同時にAPCを摂取させると、体重増加、内臓脂肪の蓄積、血栓様物質の蓄積が抑制されていることが確認された。また、マクロファージの泡沫化に関するAim遺伝子発現をAPC摂取群では抑制していた。さらに、RAW細胞をLPS存在下にAPCを加えて培養したところ、TNF- α の産生を抑制していた。

研究成果の概要(英文)：We investigated the preventive effect of procyanidins, which is major phytochemicals in apple, on atherosclerosis in ApoE-deficient mice and 3T3-L1 cells. After the ingestion of high fat diet for 20 weeks, the body weight and mesenteric, perirenal, and testis fat weights in the high fat diet group significantly increased than those of normal diet group. And, thrombus-like structure was observed in vessel of mice of the high fat diet group. On the contrary, the increases of body weight and mesenteric, perirenal, and testis fat weights in the apple procyanidin group significantly inhibited than those of the high fat diet group. Furthermore, thrombus-like structure was observed in vessel of mice of the high fat diet group. Furthermore, APC prevented the expression of Aim gene in the ApoE-deficient mice and the secretion of TNF- α in RAW264.7 cells.

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：リンゴ プロシアニジン類 動脈硬化 ApoE欠損マウス RAW264.7細胞

1. 研究開始当初の背景

(1) 欧米での疫学研究によって、果実に由来するフラボノイド類が心疾患のリスクを下げる可能性が示唆されている(Kenekt *et al.*, BMJ, 1996; Hertog *et al.*, 1993)。また、モデル動物やヒト試験において、フラボノイド類による生活習慣病予防などの健康機能性を示す結果が報告されている。

(2) フラボノイド類はその構造上の特徴からアントシアニン類やフラボノール類などさらに、いくつかのグループに分類される。プロシアニジン類(PC)はカテキンやエピカテキンを構成単位として結合し、構成単位の数(重合度)や結合位置、組み合わせによって多くの種類が存在する。食品では、果実などに多く含まれ、強い抗酸化作用や様々な生理機能性を持つ重要な成分である。しかしながら、多くの異性体や他のフラボノイド類やポリフェノール類との効率的な分離方法が確立されていなかったため、健康機能性における関与成分の特定や吸収動態などの解明は他のポリフェノール類よりも遅れていた。

(3) 我々は、リンゴ由来プロシアニジン類(APC)の順相クロマトグラフィーによる重合度別大量分離法を開発し(Shoji *et al.*, J. Chromatogr. A, 2006)、13種類のプロシアニジン類を精製、構造を明らかにしてきた(Shoji *et al.*, J. Agric. Food Chem, 2003; Abe *et al.*, Tetrahedron Lett, 2008)。APCは抗アレルギー作用、肥満抑制やコレステロール改善などの脂質代謝制御作用、メラニン生成抑制作用、抗腫瘍活性などの健康機能性が報告されている。特に、抗腫瘍効果やメラニン生成抑制作用では、APCの重合度に依存して活性が変化することを明らかにした(Shoji *et al.*, J. Agric. Food Chem, 2005; Miura *et al.*, Carcinogenesis, 2008)。また、LC/MS分析によって四量体までが体内に吸収されることや、重合度によって吸収や代謝が異なる可能性が示されている(Shoji *et al.*, J. Agric. Food Chem., 2006)。

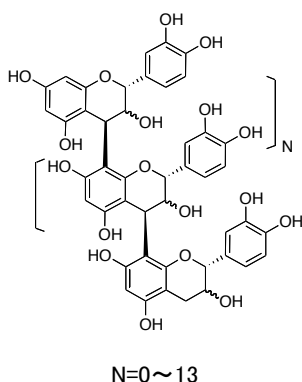


図1 リンゴ由来プロシアニジン類 (APC) の構造

(4) 我々の共同研究者であるCorder(英国)らは、赤ワインが血管内皮細胞がエンドセリン-1

(ET-1)産生を阻害することや(Corder *et al.*, Nature, 2001)、フランス国内産地のワイン中ポリフェノール含量を調べ、プロシアニジン含量とその地域の心疾患死亡率との間に強い相関を見だし、フランス「フレンチパラドックス」において、赤ワイン中のPCによるET-1産生抑制作用が関与していることを報告している(Corder *et al.*, Nature, 2006)。最近、我々はPCのET-1産生抑制に、その重合度が深く関与していることを報告した(Caton *et al.*, J. Agric. Food Chem., 2010)。

2. 研究の目的

(1) 上述のように、PCは他のポリフェノールと混在するため分離が困難であり、動脈硬化予防におけるPCの意義についての科学的に十分に検証されていない。本研究では、PCを豊富に含有し、脂質代謝制御能が報告されているリンゴのプロシアニジン類について培養細胞やApoE欠損動脈硬化モデルマウスを使い動脈硬化予防作用を検討する。

3. 研究の方法

(1) APCはリンゴ果汁から調製した。すなわち、酵素処理により清澄化したリンゴ果汁をDaiaion HP-20カラムに負荷し、ポリフェノールを吸着させる。蒸留水で洗浄後、37%エタノールで溶出しリンゴポリフェノール画分を得た。さらに、pH 6.0に調製したポリフェノール溶液をDaiaion HP-20ssカラムに負荷し、フェノール酸画分を除去し、25%エタノール溶液でプロシアニジン画分を溶出した。得られた画分はロータリーエバポレーターで濃縮、凍結乾燥によりプロシアニジン画分を得た。

(2) 5週齢の雄57BL/6.KOR-Apoe^{-/-}マウス(ApoE^{-/-}、日本SLC)および正常雄C57BL/6マウス(日本SLC)を用い、それぞれ普通食(ND)群(MF飼料、オリエンタル酵母)と高脂肪食(HFD)群(DIO 60% kcal脂肪、テストダイエット)の2群に分けた。さらに、それぞれに対し、1% APC溶液または蒸留水を自由飲水により連続摂取させた。マウスは明期(8:00-20:00)、暗期(20:00-8:00)の条件下で飼育した。APC投与20週後に、麻酔下で採血し、肝臓、脾臓、内臓脂肪(腸間膜周囲内臓脂肪、精巣上体周囲脂肪、および腎周囲脂肪組織)、腹部大動脈を摘出した。肝臓および腹部大動脈については、4%パラホルムアルデヒド・リン酸緩衝液中(Wako)で固定した(病理組織学的解析用)。また、採取した血液より血清を分離し、ラボアッセイキット(Wako)により総コレステロールおよびトリグリセライドを、ELISAにより血中LOX-1(Boster Biological Technology, Co.)および酸化LDL(USCN Life Science Inc.)を測定した。遺伝子発現解析では、動脈、肝臓における遺伝子発現を解析した。解析遺伝子は、スカベンジャーおよびマクロファージ接着に関連する遺伝子であるLox-1、Cd36、Aim、Vcam-1およびCd44、アディポカイン・サイトカインとしてTNF、IL-6、Adipoq、

MCP-1 および CXCL10、抗酸化関連遺伝子として Sod1、Sod2、Gst、Ppar γ 、Ppar α 、Gpx1、Gpx2 および Cat、糖代謝関連遺伝子として Fasn および Pck1 を定量解析した。

(3) 動脈硬化には、脂肪細胞やマクロファージが密接に関与していることから培養細胞を用いて炎症性サイトカイン (TNF- α) やアディポカイン (レプチン) 産生に与える APC の影響について検討した。すなわち、マクロファージ様細胞 (RAW264.7 細胞) および脂肪細胞 (3T3-L1 細胞) を培養後、所定の濃度になるように APC を添加し、培地中に産生されるサイトカイン量を ELISA 法で測定した。

4. 研究成果

(1) ApoE 欠損マウスでは、9 週より HFD/蒸留水対照群で有意な体重の増加が認められたが (P<0.05)、APC 投与により体重の増加は対照 (普通食) 群レベルまで抑制された (図2)。

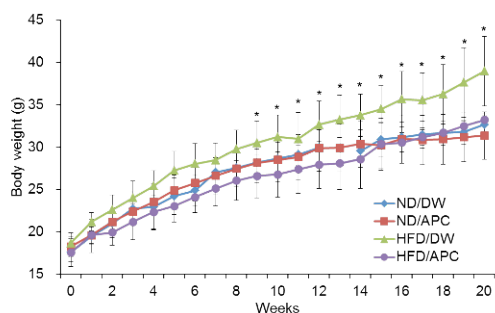


図2 APC の 20 週連続投与による ApoE^{-/-}マウスの体重変化

(2) ApoE 欠損マウスの HFD 群では、APC 長期投与により血中 LDL の減少傾向が認められた。さらに、血中レプチン濃度は HFD/蒸留水対照群で有意 (P<0.05) に増加しているのに対し、HFD/APC 投与群では対照群レベルまで抑制された。

(3) ApoE 欠損マウスの脾臓および肝臓重量はすべての群で有意差は認められなかった。一方、ApoE 欠損マウスにおいて、HFD/蒸留水対照群で内臓脂肪、精巣周囲脂肪、腎臓周囲脂肪および総脂肪重量が有意 (P<0.05) に増加した。しかし、HFD/APC 投与群では対照群レベルまで抑制された。

(4) 病理組織学的解析の結果、ApoE 欠損マウスの HFD/蒸留水対照群では肝小葉中心性に広範な肝細胞への脂肪沈着が認められ、大滴性脂肪肝が疑われる組織像を呈していた。一方、HFD/APC 投与群では顕著な脂肪沈着は認められず、APC 投与により、HFD 誘発性の脂肪肝発症が抑制されたと考えられる。さらに、ApoE 欠損マウスの HFD/蒸留水対照群では、明瞭なアテローム性動脈硬化像は認められなかったが、腹腔静脈においてフィブリン沈着を伴う血栓様構造が認められた。しかしながら、これらの病巣

は ND 群および HFD/APC 投与群では認められなかった。

(5) 動脈硬化の発症には泡沫化 (不活化) マクロファージが関与することが報告されている。病態形成に関与するマクロファージではアポトーシスを抑制する Aim (apoptosis inhibitor of macrophage) 遺伝子が発現し、酸化 LDL の取り込みによる細胞死が抑制されている。Aim 遺伝子の発現に及ぼす APC の影響を解析した。腹腔動脈では、対照水投与 C57BL/6.KOR-Apoesh1 マウスにおいて高脂肪食負荷により Aim 遺伝子の発現が上昇するが、APC 投与により、高脂肪食負荷による Aim 遺伝子発現の上昇がコントロールレベルまで有意に抑制された。C57BL/6 マウスでも同様の傾向が認められた。肝臓においても腹腔動脈と同様の結果が得られたことから、APC は脂肪食負荷によるマクロファージの不活化を抑制する作用を有することが示唆された (図3)。

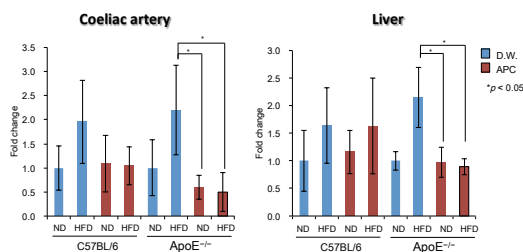


図3 ApoE^{-/-}マウスにおける Aim 遺伝子発現にあたる APC の影響

(6) RAW264.7 細胞を LPS (リポポリサッカライド) 存在下で培養すると、炎症性サイトカインである TNF- α が培地中に産生される。APC を添加することによって、TNF- α 産生が抑制することが確認された (図4)。

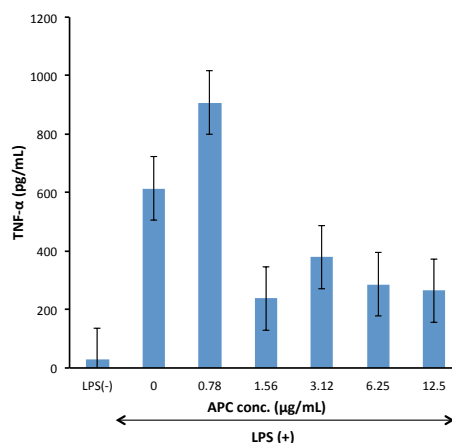


図4 RAW264.7 細胞における LPS 刺激による TNF- α 産生の APC による抑制効果

以上より、APC は高脂肪食摂取によるラジカル産生によって生じる脂肪組織や血管内皮での炎症を抑制し、動脈硬化の初期段階であるマクロ

ファージの泡沫化を抑制することによって動脈硬化症を予防する可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 0 件)

[学会発表] (計 0 件)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]
出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

[その他]
該当なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

庄司 俊彦 (SHOJI, Toshihiko)
独立行政法人農業・食品産業技術総合研究
機構・果樹研究所 栽培・流通利用研究領
域・主任研究員
研究者番号: 90582510

(2) 研究分担者

三浦 富智 (MIURA, Tomisato)
国立大学法人・弘前大学・准教授
研究者番号: 20261456