

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 6 日現在

機関番号：15401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2012～2013

課題番号：24890143

研究課題名(和文) ECによる心血管イベント抑制効果の詳細な分子機序の解明と生体における作用の検討

研究課題名(英文) Preventive mechanisms of Epicatechin against cardiovascular event and examination of the action in the living body

研究代表者

永安 慎太郎 (NAGAYASU, SHINTARO)

広島大学・大学病院・歯科診療医

研究者番号：60635192

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円、(間接経費) 690,000円

研究成果の概要(和文)：歯周病などで惹起される軽微な慢性炎症が動脈硬化の増悪因子となり得ることが示唆されている。一方、ダークココアの経口摂取によって心血管イベント発生率が減少する事が報告され、その主成分であるエピカテキン(EC)の心血管イベント抑制効果が注目されている。本研究では、EC による心血管イベント抑制効果の分子機序の解明を脂肪細胞 - マクロファージ相互作用説に着目して解析を進めた。両細胞の共培養系にLPS 刺激を加えた際の炎症関連分子の動態変化を解析した結果、ECを添加することで炎症関連分子の産生抑制が確認できた。これらの結果からECの抗炎症作用によって心血管イベント発生率が減少する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：It is suggested that minimal chronic inflammation caused by periodontal disease can become the arteriosclerotic exacerbation factor. On the other hand, it is reported by ingestion of the dark cocoa that a cardiovascular event incidence decreases, and a cardiovascular event suppressant effect of epicatechin(EC) which is the chief ingredient attracts attention. I paid my attention to Adipocyte-macrophage interaction and, in this study, examined the molecular mechanism of the cardiovascular event suppressant effect by the EC. As a result of having analyzed the change of inflammatory related molecules when I added LPS stimulation to the co-cultures, I was able to confirm the producing decrease of inflammatory related molecules by adding EC. These results suggested the possibility that a cardiovascular event incidence decreased by anti-inflammatory effect of the EC.

研究分野：歯周治療系歯学

科研費の分科・細目：歯周治療系歯学

キーワード：エピカテキン

1. 研究開始当初の背景

肥満、特に内臓脂肪型肥満は高血圧、異常脂質血症、2型糖尿病のリスクファクターであり、これらの疾患が重複することで動脈硬化症を発症するリスクが増加することから、これらの疾患を合併した状態はメタボリックシンドローム(Mets)と呼ばれている。Metsはインスリン抵抗性を基盤として動脈硬化症を発症・進展させると考えられているが、このMetsの発生機序に脂肪組織の炎症性変化が重要な役割を果たしていることが近年の研究により明らかとなった(Xu H et al., *J Clin Invest*, 2003)。さらに、脂肪組織からのアディポカイン産生に、マクロファージが関与することが報告された。すなわち、末梢から脂肪細胞周囲に遊走・浸潤したマクロファージによって産生される種々のサイトカインが脂肪細胞に働くことで脂肪組織からのアディポカイン産生異常を惹起し、2型糖尿病やMetsの発症・進展をさらに促進するという、脂肪細胞-マクロファージ相互作用説である(Shimomura I et al., *Nature Medicine*, 1996)。それに加えてマクロファージ自体も遊離脂肪酸(FFA)やグラム陰性菌由来内毒素(lipopolysaccharide; LPS)を toll-like receptor 4 (TLR4) を介してリガンドとして認識し Tumor Necrosis Factor-alpha(TNF- α) を分泌することで、脂肪組織における炎症がさらに亢進すると報告された(Weisberg SP et al., *J Clin Invest*, 2003)。また、歯周病の動脈硬化への関与も指摘されている。C反応性タンパク(CRP)の軽度上昇は虚血性心疾患の予知因子となることが報告されているが、歯周病細菌 *Porphyromonas gingivalis* (Pg.) に対する血清 IgG 抗体価と末梢血中 CRP 濃度は正の相関を示すことから、歯周病は軽微な慢性炎症反応を生体に惹起し、動脈硬化の進行促進因子として作用する可能性があると考えられている(Nshimura F., *Diabetes Care*, 2002)。

一方、ダークココアの経口摂取によって心血管系疾患の発症率が減少するとした大規模疫学研究結果が報告され、その主成分 epicatechin (EC) による心血管系疾患の抑制効果が注目されている(Brian B., *Arch InternMed*, 2006)。そこで申請者は、ECが脂肪細胞-マクロファージ相互作用において、脂肪細胞またはマクロファージのいずれか、もしくは両者における炎症性シグナルを阻害することで、脂肪組織における炎症を軽減し結果的に動脈硬化抑制作用を発揮するという仮説を設け検証を行った。その結果、ECを作用させたLPS刺激下共培養系における脂肪細胞で、炎症性サイトカインやケモカインの遺伝子発現抑制を確認した。また、ECは主にマクロファージの活性化を抑制している事が明らかとなった。以上より、ECは細菌感染による脂肪細胞-マクロファージ相互作用系における炎症反応の増幅を抑制

することで、心血管イベントリスクを低下させる可能性が示唆された。

2. 研究の目的

申請者らのグループはその機序として脂肪細胞-マクロファージ相互作用説に着目して解析を進めてきた。一方、ダークココアの経口摂取によって心血管イベント発生率が減少することが報告され、その主成分であるECによる心血管イベント抑制効果が注目されている。申請者は、ECを作用させた両細胞の共培養系にLPS刺激を加えた際の炎症関連分子の動態変化を解析することで、ECに炎症抑制効果があることを示唆する結果を得ている。ECは抗癌作用や動脈硬化抑制作用、抗肥満作用と言った多くの生理活性作用を持っているが動脈硬化抑制作用についてはそのほとんどがECのラジカル捕捉作用、金属キレート作用といった抗酸化作用に着目したものであり、軽微な感染症などで惹起される脂肪細胞-マクロファージ相互作用での炎症増幅にカテキンが及ぼす影響についての報告は皆無であり、詳細な分子機序も報告されていない。心臓病による死因の多くが心筋梗塞と狭心症が占め、いずれも動脈硬化をもとに発症・進行する。近年ライフスタイルが欧米化し肥満人口が増加するに伴ってこれらの傾向は顕著になることが予想されるため、動脈硬化に対する新たな治療戦略の社会的需要は大きいといえる。また、日本人に多い軽度肥満者は動脈硬化症に加えて高血圧症の併発率が高いことから、血圧上昇抑制作用を有するカテキンの作用機序の解明はメタボリックシンドロームに対する新たな治療戦略の構築において多大な貢献をもたらすといえる。またECの抗炎症作用、殺菌作用によって生体に対して慢性炎症を引き起こす歯周疾患の増悪を回避する事ができるという意義も大きい。以上のことから本研究はECによる心血管イベント抑制効果の詳細な分子機序の解明を目的とし、それによって新規の治療戦略の構築へ発展を目指す。

3. 研究の方法

(平成24年度)

1) ECの標的分子の同定

LPS/TLR4シグナルによって、炎症性サイトカイン遺伝子発現を制御する転写因子であるNF- κ Bが活性化されるが、ECはこの活性化を抑制することが申請者のこれまでの検討から明らかになっている。よって、まず、TLR4シグナル下流に存在しNF- κ Bの活性化に関与するタンパク質に対するECの影響を検討することによりECの標的分子の同定を図る。具体的には、マウスマクロファージ細胞株RAW264.7および脂肪細胞にLPS刺激を行い、EC添加群および非添加群の細胞ライセートのウェスタンブロット分析により、TAK1、TRAF6、IRAK等、右図に示すような種々の関連タンパク質の活性化に対するECの影

響を検討する。EC が影響を及ぼすものうち、TLR シグナル伝達の最も上流に存在するタンパク質を EC の標的の候補とする。標的タンパク質の候補が見出せれば、ビオチン化した EC を用いて、アフィニティークロマトグラフィによって EC と結合することを確認し標的タンパク質として同定する (KuboN *et al.*, *Proc Natl Acad Sci*, 1999)。その後同定した遺伝子のノックダウンを行い、LPS 刺激による TLR4 シグナル伝達において EC 添加の有無による差はないことを、関連タンパク質群のウェスタンブロット分析および炎症性サイトカインの遺伝子発現についての検討から確認する。また、ここで見出した標的タンパク質が EC のなかでも EC 特異的な標的であるかどうか調べるため、EC と同様なインスリン抵抗性改善作用が認められている EC およびそれ以外の EC をそれぞれビオチン化し、同定したタンパク質との結合の有無を確認する。EC の標的となるタンパク質が特定できなかった場合には、より幅広い候補の中から EC と親和性のあるタンパク質を探索する必要がある。LPS 刺激マクロファージの細胞ライセートおよびビオチンタグを付与した EC を、アビジンを固定化したカラムに入れ、ビオチンタグで標識された化合物を回収する。特異的に結合したタンパク質を SDS-PAGE にて分離しクマシー染色で可視化した後、質量分析で同定し、さらにウェスタンブロット分析により確認する。この時結合するタンパク質が全く採れない場合や、反対にさまざまな種類のタンパク質が結合する場合は考えられ、その際にはビオチン化の条件検討をし直し、相互作用のあるタンパク質を数種類選択してから検討する (Kaida D *et al.*, *Nat Chem Biol*, 2007)。

2) 同定された標的タンパク質の機能解析

1)において同定された標的タンパク質について、*in vitro*でのノックダウンや過剰発現系において、その分子の性質に応じ関連する機能解析を行う。さらに、*in vivo*における機能解析として、炎症の誘発や高脂肪食を摂取したマウスにおいて、標的タンパク質の挙動について検討する。

(平成 25 年度)

3) ApoEKO male mice を用いた EC の抗動脈硬化作用の検討

実験動物は、動脈硬化症発症モデルマウスである ApoEKO male mice を用いる。7 週齢の ApoEKO male mice を以下の 3 群に分けて比較検討する。第 1 群として普通食 (nomal diet) を与えて PBS を経口投与したもの、第 2 群として高脂肪食 (high-fat diet) を与えて PBS を経口投与したもの、第 3 群として高脂肪食を与え EC を経口投与する。EC 摂取量は 0.76mg/day とする。この摂取量は人が 1 日にココアを 2~3 杯摂取したものと同等の量である。EC は 20%エタノールで溶解しゾンデで経口投与する。実験開始 4 週間に実

験を終了しマウスを 12 時間絶食させた後、屠殺し、血清を採取する。その後、PBS で虚血還流し、実体顕微鏡下で大動脈を摘出する。大動脈は切開し、内皮組織が表になるようにシリコン樹脂上に針で固定した後、4%パラホルムアルデヒドで固定処理を行う。固定処理した大動脈はナイルレッドで脂質染色し、蛍光実体顕微鏡で観察するとともに、写真撮影して、動脈硬化部位の画像解析を行う。また同時に、肝臓、脂肪組織、を回収し各群を比較し、EC の抗動脈硬化作用について検討を行う。

4. 研究成果

EC は炎症性サイトカイン遺伝子発現を制御する転写因子である NF- κ B の活性化を抑制することが申請者のこれまでの検討から明らかになっている。よって TLR4 シグナル下流に存在し NF- κ B の活性化に關与するタンパク質に対する EC の影響を検討することにより EC の標的分子の同定を図った。その結果、いくつかの候補は絞られたが、NF- κ B の活性化に關与するタンパク質群の数は多く、有力なタンパク質が特定できなかったため、より幅広い候補の中から EC と親和性のあるタンパク質を探索する必要性が生じた。そこで、ビオチンタグで標識した EC と LPS 刺激をしたマクロファージの細胞ライセートを固定化したカラムに入れ、ビオチンタグで標識された化合物を回収しサンプルを得た。今後は特異的に結合したタンパク質を分離しクマシー染色で可視化した後に質量分析で同定、さらにウェスタンブロット分析により確認するという作業を現在継続して行っている。結合するタンパク質が全く採れない場合や、多数のタンパク質が結合する場合は考えられ、その際にはビオチン化の条件検討をし直し、相互作用のあるタンパク質を数種類選択してから再度検討する予定である。また EC の *in vivo* における作用を確認するため ApoE KO male mice を用いた EC の抗動脈硬化作用の検討を行った。実験動物は、動脈硬化症発症モデルマウスである ApoEKO male mice を用いた。7 週齢の ApoEKO male mice を 3 群に分けて比較検討した。第 1 群として普通食 (nomal diet) を与えて PBS を経口投与したもの、第 2 群として高脂肪食 (high-fat diet) を与えて PBS を経口投与したもの、第 3 群として高脂肪食を与え EC を経口投与する。EC は 20%エタノールで溶解しゾンデで経口投与した。実験開始 8 週間に実験を終了しマウスを屠殺し、血清を採取した。固定処理した大動脈はナイルレッドで脂質染色し、蛍光実体顕微鏡で観察するとともに、写真撮影して、動脈硬化部位の画像解析を行った。画像解析の結果、EC 投与群と非投与群の間には動脈硬化の進行に優位な差は見られなかった。この結果を踏まえて現在は EC の投与するマウス年齢、投与する期間において条件を変え検討中である。

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)

The Inflammation-lipocalin2 axis may contribute to the development of chronic kidney disease. Hashikata A, Yamashita A, Suzuki S, Nagayasu S, Shinjo T, Taniguchi A, Fukushima M, Nakai Y, Nin K, Watanabe N, Asano T, Abiko Y, Kushiya A, Nagasaka S, Nishimura F. *Nephrol Dial Transplant*. 2014.Mar;29(3):611-8 .(査読有り).

Smoking and adipose tissue inflammation suppress leptin expression in Japanese obese males: Potential mechanism of resistance to weight loss among Japanese obese smokers. Shintaro Nagayasu, Shigeki Suzuki, Akiko Yamashita, Ataru Taniguchi, Mitsuo Fukushima, Yoshikatsu Nakai, Naoya Watanabe, Shoichiro Nagasaka, Daisuke Yabe, Kazuko Nin, Fusanori Nishimura. *Tobacco Induced Diseases*. 2012.Feb 28;10:3. (査読有り).

Adipocyte-macrophage interaction may mediate LPS-induced low-grade inflammation: potential link with metabolic complications. Hideo Nakarai, Akiko Yamashita, Shintaro Nagayasu, Misaki Iwashita, Sonoko Kumamoto, Hideki Ohyama, Masaki Hata, Yoshihiko Soga, Akifumi Kushiya, Tomoichiro Asano, Yoshimitsu Abiko, Fusanori Nishimura. *Innate Immun*. 2012.Feb;18(1):164-70. (査読有り).

〔学会発表〕(計 2件)

永安慎太郎, 山下明子, 鈴木茂樹, 西村英紀 ココアフラボノールの抗炎症作用による動脈硬化抑制作用の検討 第54回日本歯周病学会春季学術大会 福岡 27, 28 May 2011

永安慎太郎, 山下明子, 鈴木茂樹, 西村英紀 2型糖尿病患者におけるココアフラボノールの心血管イベント抑制効果機序の検討～脂肪細胞・マクロファージ相互作用の観点から～ 第25回日本糖尿病合併症学会 滋賀 22, 23 Oct 2010

6. 研究組織

(1)研究代表者

永安慎太郎 (NAGAYASU SHINTARO)

広島大学・大学病院・歯科診療医

研究者番号: 60635192