

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 12 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25504014

研究課題名(和文) 海藻抽出物による一酸化窒素産生機序の解明と機能性食品としての有用性の検討

研究課題名(英文) Investigation of the mechanism of nitric oxide production by an extract of brown marine algae and its usefulness as a functional food

研究代表者

家崎 貴文 (Iesaki, Takafumi)

順天堂大学・医学部・先任准教授

研究者番号：10348956

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：フコイダンは海藻類のヌメリ成分に含まれる天然の硫酸多糖類である。本研究の目的は、フコイダンの、心臓・血管系に対する作用を科学的に明らかにし、分子メカニズムを解明し、機能性食品としての有用性の科学的根拠を明らかにすることである。本研究により、フコイダンは血管内皮細胞に作用し、血管内皮の一酸化窒素合成酵素を活性化させ、血管内皮細胞から一酸化窒素を産生させ血管を弛緩させることが、ラットの摘出大動脈標本を用いた実験により明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Fucoidan is a natural sulfated polysaccharide obtained from brown marine algae composed predominantly of sulfated fucose. The objectives of the present study are to investigate the effects of fucoidan on cardiovascular system and to explore the mechanism(s) of action, leading to the clarification of scientific basis of its usefulness as a functional food. The present study showed that fucoidan caused vascular relaxation through endothelium-dependent, nitric oxide (NO)-mediated mechanism in isolated rat aorta and this relaxation seemed to be caused through an activation of endothelial nitric oxide synthase (eNOS).

研究分野：生理学

キーワード：血管内皮細胞 一酸化窒素 血管弛緩反応 フコイダン 一酸化窒素合成酵素

1. 研究開始当初の背景

近年国民の健康に対する意識の高まりから、健康食品やサプリメントに対する関心も高まっている。厚生労働省は一定の基準を設け、「特定保健用食品」と「栄養機能食品」の2つを「保健機能食品」として認めており、最近では食品の持つ機能性に関する研究が国内外で盛んに行われている。機能性食品という言葉はわが国が提唱したものであり、基本概念は生理系統（免疫、分泌、神経、循環、消化）の調節によって病気の予防に寄与する新食品のことである。我々は天然の食品に含まれる成分で、心臓・血管系に薬理作用が期待できる幾つかの物質の作用を検討した結果、コンブ等の海藻類のヌメリ成分に含まれるフコイダンという物質に注目した。摘出ラット大動脈標本を用いたこれまでの研究の結果、フコイダンは(1). 濃度依存的に血管を弛緩させる(2). この弛緩作用は血管内皮依存的である(3). 一酸化窒素(nitric oxide、NO)-サイクリックGMP系を介する作用であることを世界に先駆けて発見した。フコイダンはL-フコースと呼ばれる単糖を主な構成成分とする多糖類の総称であり、構成糖として硫酸基を含んでいる。1990年代に抗ガン作用が報告されたことをきっかけに健康食品として注目され始め、その作用は抗凝固作用、抗アレルギー作用、抗酸化作用、抗炎症作用、抗動脈硬化作用、抗腫瘍転移作用等多岐にわたっている(文献)。天然由来の抽出物であるため副作用がほとんどないと考えられ、欧米では代替医療として用いる研究が始まっているが、心臓・血管系に対する作用の報告は現在まで皆無であり、今回我々が世界で初めて発見した作用である。

血管内皮細胞はNOを代表とする種々の血管拡張物質を放出し、血管の拡張及び、血管壁への炎症細胞の接着、血管透過性、凝固・線溶系の制御等に関与している。NOはアセチルコリンやブラジキニン、その他種々の刺激によりその産生が刺激されることが知られている。また、血管内皮機能は、高血圧や糖尿病、脂質異常症、肥満、メタボリックシンドローム等、様々な生活習慣病によってその機能が低下することが知られており、NOの生物学的利用能の低下がその本態である。血管内皮機能の低下は動脈硬化の初期変化として考えられており、血管内皮機能の改善が動脈硬化の予防に繋がると考えられている。血管内皮細胞からのNOの産生を刺激する手段、方法が開発されれば、これは内皮機能の改善と同様の効果があると考えられ、現在盛んに研究が行われている。一方、フコイダンは、マクロファージや血管内皮細胞などに発現している、クラスAスカベンジャー受容体(SR-A)のリガンドとしても知られている。抗動脈硬化作用があると考えられているリポ蛋白であるHDLが、血管内皮のクラスBスカベンジャー受容体(SR-BI)を介して、内皮型一酸化窒素合成酵素(eNOS)を活性化させることは報告されており(文献)、スカベンジャー受容体の刺激とeNOSの活性化の関連を考える上で大変興味深い。本研究により、クラスAスカベンジャー受容体刺激がeNOSを活性化するということが証明されれば、NOの産生に関する全く新しい経路が世界で初めて発見されたことになり、学術的意義は非常に高い。

2. 研究の目的

現在までの研究の結果、フコイダンの血管系に対する作用として、血管内皮細胞から NO を産生させる作用があることが予想されるが、作用する受容体以下、NO の産生までの間の作用メカニズムは全く未解決のままである。また、心筋に対する直接作用は全く研究されていない。また、過剰な NO の産生は、細胞障害性のあるパーオキシナイトライト (ONOO⁻) の産生に繋がり、心筋の虚血-再灌流障害を増悪させるという報告もある。従って、本研究の研究期間内においては、1. フコイダンによる血管弛緩のメカニズムの全貌を解明する 2. 心臓の生理機能や心筋の虚血-再灌流障害に対する直接作用を明らかにする 3. 経口摂取した場合の心臓・血管系に対する作用をモデル動物を用いて解析することを計画している。以上の研究を通して、生体内での NO 産生における全く新しい経路の発見に繋げるとともに、フコイダンを食品として摂取した場合の安全性、有用性及び副作用の有無を検証する。

3. 研究の方法

- (1) フコイダンの血管弛緩作用のメカニズムの検討・ラット大動脈リング標本を用いた張力測定実験：細胞内シグナリング分子の各種の阻害薬等を用いた薬理実験を行い、フコイダンが NOS を活性化する経路を検証する。
- (2) フコイダンによる NO 産生の証明・培養血管内皮細胞を用いた実験：培養細胞から eNOS によって産生される NO は非常に微量であり、予備実験の結果、従来のグリース法では検出が困難と考えられ、本研究でより感度の高い蛍光

法を用いる。それでも不十分な場合は、近年開発された NO 蛍光指示薬 (DAF-FM DA) を用いることにより、細胞における NO の産生をイメージングにより解析する。

- (3) フコイダンによる eNOS の活性化のメカニズムの解析・培養血管内皮細胞を用いた実験：eNOS の活性化の指標である Ser 1177 残基のリン酸化に対する効果をウェスタンブロッティング法で検出する。摘出血管を用いた実験と同様、PI3 キナーゼ阻害薬や、各種キナーゼの阻害薬、その他の細胞内シグナリング分子の阻害薬等を用いて、eNOS の活性化の細胞内シグナリング経路を解析する。
- (4) フコイダンの心臓に対する作用及び虚血-再灌流障害に対する作用の検討・ラットランゲンドルフ灌流実験：摘出したラット心臓の大動脈にカニューレを挿入し、逆行的に心臓を定流量で灌流するランゲンドルフ摘出灌流心モデルを作製する。心拍数、左心室発生圧、左心室拡張終期圧、冠灌流圧を記録し、フコイダンの心臓に対する作用を検証する。不可逆的な心筋障害については、心臓から滴下する灌流液中の逸脱酵素 (本実験では AST) の遊離量を測定評価することにより評価する。また、正常ラットの虚血-再灌流障害モデル (低酸素 30 分間-再酸素化 30 分間) において、フコイダンの心筋保護効果の有無を検討する。
- (5) フコイダン摂取モデル動物の作製
モデル動物の作製：ランゲンドルフ灌流実験で得られた結果をもとに、ラッ

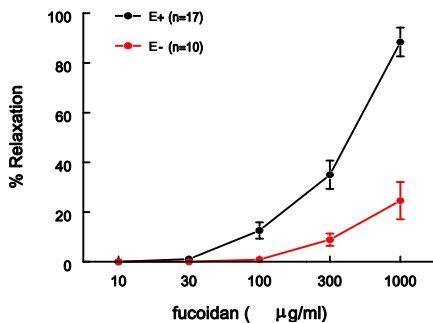
トに一定期間フコイダンを経口投与したモデルを作製する。血圧、脈拍に対する効果を観察し、適切な投与量、投与期間を設定する。あまり変化がみられない場合には、灌流実験で得られた結果をもとに投与量、投与期間を設定する。

- (6) 虚血-再灌流障害に対するフコイダンの慢性投与の効果の検討・モデル動物におけるランゲンドルフ灌流実験：モデル動物より摘出した心臓を用いてランゲンドルフ灌流実験を行う。正常ラットと比較し、フコイダンの経口摂取の効果を検討する。

4. 研究成果

- (1) フコイダンの血管弛緩作用における血管内皮の影響；

血管内皮を機械的に剥離することにより、フコイダンの血管弛緩作用は有意に減弱したが、完全には消失しなかった（図1）。



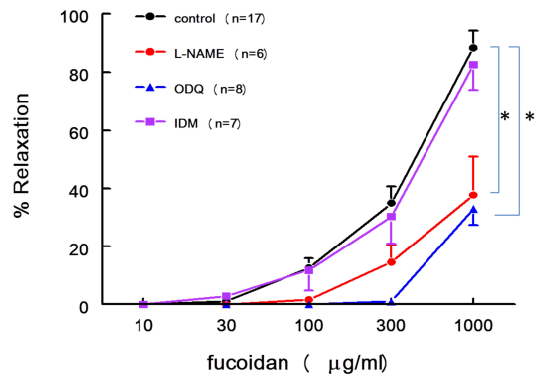
（図1）フコイダンの血管弛緩作用における血管内皮の影響。E+； 内皮温存標本、E-； 内皮剥離標本。

これにより、フコイダンは血管内皮依存性の弛緩を引き起こすことが考えられたが、一部は血管内皮非依存性の弛緩を引き起こすことが考えられた。

すことが考えられた。

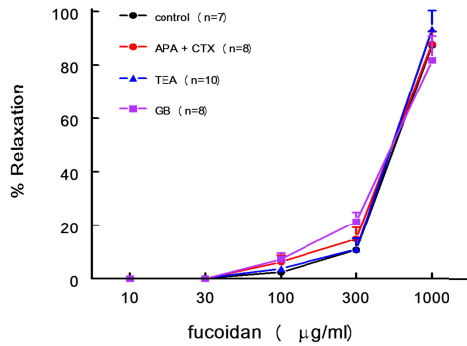
- (2) フコイダンの血管弛緩作用における種々阻害薬の影響；

フコイダンの血管弛緩作用は、一酸化窒素合成阻害薬である L-NAME (N(G)-nitro-L-arginine methyl ester)、および、可溶性グアニル酸シクラーゼ阻害薬である ODQ (1H[1,2,4] oxadiazolo- [4,3-a]quinoxalin-1-one) により有意に減弱した。また、シクロオキシゲナーゼ阻害薬であるインドメタシンによっては影響を受けなかった（図2）。



（図2）フコイダンの血管弛緩作用における種々阻害薬の影響

さらに、フコイダンの血管弛緩作用は、アパミン (APA)、キャリブドトキシン (CTX)、テトラエチルアンモニウム (TEA)、およびグリベンクラミド (GB) 等、種々のカリウムチャンネル阻害薬によっても影響を受けなかった（図3）。

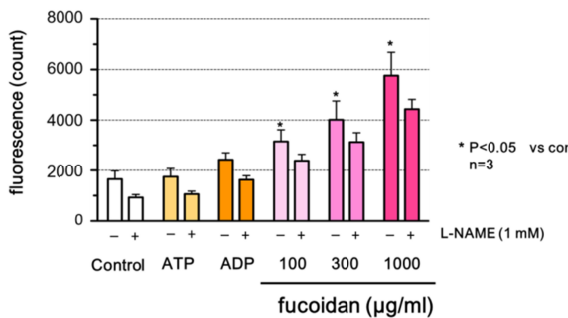


(図3) フコイダンの血管弛緩作用における種々のカリウムチャンネル阻害薬の影響

これらの結果より、フコイダンは血管内皮から一酸化窒素を産生させ血管弛緩反応を引き起こす可能性が考えられた。

(3) フコイダンによる血管内皮細胞からの一酸化窒素の産生；

フコイダンは培養血管内皮細胞から、濃度依存的に一酸化窒素を産生させることが明らかとなった(図4)。この一酸化窒素の産生は L-NAME により抑制された。



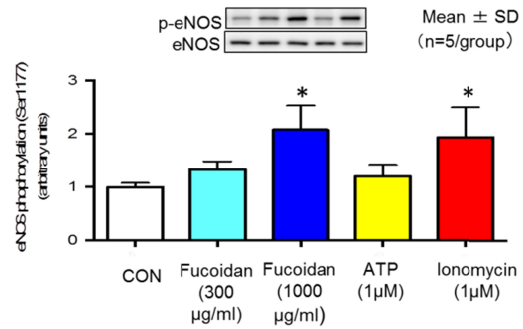
(図4) フコイダンによる血管内皮細胞からの一酸化窒素の産生

(4) フコイダンによる一酸化窒素合成酵素 (eNOS) の活性化の証明；

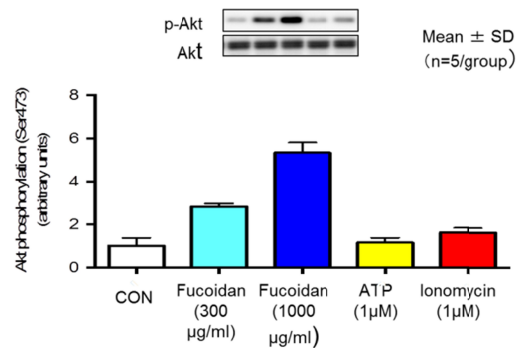
ウェスタンブロッティング法により、フコイダンは培養血管内皮細胞における eNOS

を活性化させることが明らかとなった(図5)。

(A)



(B)



(図5) フコイダンによる一酸化窒素合成酵素 (eNOS) の活性化。 (A); eNOS (Ser 1177) のリン酸化。 (B); Akt (Ser 473) のリン酸化。

(5) まとめ；

本研究により、フコイダンは血管内皮細胞に作用し、血管内皮の一酸化窒素合成酵素を活性化させ、血管内皮細胞から一酸化窒素を産生させ、血管を弛緩させることが明らかとなった。引き続き、フコイダンが作用する受容体の同定や、心臓に対する作用の検討のためのランゲンドルフ灌流実験、また、その結果に基づいたフコイダン摂取モデル動物の作製等を行うことを計画しているが、本研究の研究期間中に、従来よりも

純度の高いフコイダン試薬が販売されるようになったため、新たな試薬を用いて従来と同様の実験を行う必要性が生じ、これらの実験の遂行に相当の時間を要することとなった。その結果、従来の試薬を用いた場合と実験結果が一部異なることが明らかとなり、研究計画を変更する必要性が生じた。最終年度においては、従来のフコイダン試薬と、新たなフコイダン試薬の成分の生化学的手法による分析や、血管床を変更しての検討等を検討し、新たな実験方法を導入した研究に着手したが、研究計画の変更に伴う時間的制約により、研究期間中には十分な成果を得ることが出来なかった。しかしながら、従来の試薬を用いた、フコイダンの血管弛緩作用のメカニズムについてはほぼ解明できており、また、現在まで報告されているフコイダンの作用・効果については、従来の試薬を用いたものがほとんどであるため、本研究で明らかとなったフコイダンの血管系に対する作用とそのメカニズムの詳細について、今後論文として報告する予定である。

<引用文献>

Sulfated fucans, fresh perspectives: structures, functions, and biological properties of sulfated fucans and an overview of enzymes active toward this class of polysaccharide. Berteau and Mully. *Glycobiology*, 13; 29R-40R, 2003

HDL stimulation of endothelial nitric oxide synthase: a novel mechanism of HDL action. Mineo and Shaul. *Trends Cardiovasc Med*, 13:226-31,

2003

5. 主な発表論文等

[学会発表](計1件)

Takafumi Iesaki, Tomoaki Takeuchi, Megumi Okano, Ryota Hashimoto, Ryo Kakigi, Yuko Ishii, Takao Okada. Fucoidan, a ligand of scavenger receptor class A, causes vascular relaxation through a nitric oxide/cGMP-mediated pathway in rat aorta. 82nd European Atherosclerosis Society (EAS) Congress, MAY 31st to JUNE 3rd 2014, MADRID, SPAIN

6. 研究組織

(1) 研究代表者

家崎 貴文 (Iesaki, Takafumi)
順天堂大学・医学部・准教授
研究者番号：10348956

(2) 研究分担者

渡邊 マキノ (Watanabe, Makino)
順天堂大学・医学部・准教授
研究者番号：00255655

(3) 連携研究者

橋本 良太 (Hashimoto, Ryota)
順天堂大学・医学部・助教
研究者番号：60433786

柿木 亮 (Kakigi, Ryo)
順天堂大学・医学部・助教
研究者番号：70614931