

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 8 月 28 日現在

機関番号：32301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2016

課題番号：25560034

研究課題名(和文)食品機能性成分の血管新生抑制—評価法の開発と新規物質の探索

研究課題名(英文)Antiangiogenic substances in functional food components -A new assay system for screening

研究代表者

山野 春子(YAMANO, Haruko)

上武大学・医学生理学研究所・客員研究員

研究者番号：90242338

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,500,000円

研究成果の概要(和文)：食品中の様々な機能性成分に着目し、本研究は癌などの悪化に關与する血管新生を制御する作用をもつ食品成分の探索と評価法の検討を行った。

探索はマトリゲルとともにヒト臍帯静脈血管内皮細胞(HUVEC)を培養し、添加した探索物質のネットワーク形成能の差違を評価して行った。さらに、HUVECとヒト成人皮膚線維芽細胞の共培養系を作製し、形成される細管に対する物質の制御効果を解析ソフトで定量化する方法を検討した。

その結果、肥満の予防や改善に有効とされるある物質が、血管新生の促進作用を示すことが明らかになった。本物質の促進作用については国内外で報告がなく、血管再生療法の一助としての新たな展開が期待できる。

研究成果の概要(英文)： In this research, the search for the substances with antiangiogenic effect in functional food components, and the development of the assay system for the effect were carried out.

Human Umbilical Vein Endothelial Cells (HUVEC) and test substances were added in Matrigel and cultured, and then the formed networks were observed by a microscope. Subsequently HUVEC and Normal Human Dermal Fibroblasts (NHDF) were co-cultured with the network-forming tested substances, and the formed tubules were dyed by the monoclonal antibody. The dyed tubules were quantitatively analyzed by a software.

The analysis showed that a certain substance, which provides the obese prevention and improvement, does not suppress angiogenesis and promotes it. These results have not been reported home and abroad yet. Therefore I expect that these results are helpful in the field of revascularization therapy in the future.

研究分野：食品機能学

キーワード：食品機能性成分 血管新生 in vitro 血管内皮細胞 線維芽細胞 共培養 VEGF

1. 研究開始当初の背景

食品成分中には、これまでに茶葉中のカテキン、ニンニク中のアリシン、タマネギやそば粉中のケルセチンやその配糖体のルチン、大豆中のイソフラボンなど抗酸化作用、抗菌作用、降圧作用など様々な機能をもつ物質が存在することが報告されている。さらに、がんを引き起こすとされる DNA の突然変異を抑制する抗変異原性作用もあることが報告されており、がんをはじめとする生活習慣病の予防や改善に有効な物質を多く含むことが知られている。

一方、血管の成長は胎児の正常な発育過程には必要不可欠であり、成体での血管の成長と退縮は創傷治癒をはじめ極めてよく制御されている。しかし、この制御が崩壊すると既存の血管から新しく血管枝が生じる血管新生と呼ばれる現象が生じ、がんにおいてはこの血管を介して栄養や酸素に富んだ血液が腫瘍に豊富に供給され、がんの増大や転移を引き起こすとみられている。また、病的血管新生は、糖尿病性網膜症、リウマチ様関節炎などの病態の悪化にも深く関与することが明らかになっている。

血管新生には血管内皮の増殖、分化が関わっているが、これを制御する因子群の同定と解析が飛躍的に進み、代表的な因子群として Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) 群とその受容体システム、アンジオポエチンとその受容体システムなどが明らかにされている。とりわけ 1980 年代に単離されたタンパク質である VEGF とその受容体システムは、これらの因子群の中でも特異的かつ普遍的な因子として注目され、病的血管新生を制御するためには、これを標的とした制御物質の検討を行うことが有効と考えられ、抗ヒト VEGF 中和抗体など血管新生制御関連の治療薬の開発は枚挙にいとまがない。しかし、血管新生を制御する物質は循環血中で長時間にわたって一定のレベルが維持できるような投与方法が必要であるとされており、できるだけ副作用が少ない物質が要求されている。

2. 研究の目的

上で述べた研究背景を踏まえ、本研究は血管新生の制御物質を、種々の食品成分を探索することによって検出することを目的とした。一概には言えないが、食品成分から得られる物質は人体に対し副作用が少ない物質である可能性が高いことが期待できるため、食品成分から血管新生の制御物質を見いだすことは意義があるものと考えた。

また、*in vivo* で生じる血管新生を最もよく反映するような *in vitro* の評価法を内皮細胞の共培養系を用いて作製し、検出した物質の制御効果を定量化し、さらに制御機構の解明を行うことを目的とした。

3. 研究の方法

研究の着手当初、生体内で生じる血管新生を最もよく反映する内皮細胞の培養系として、系統の一定したラット肝臓の類洞壁内皮細胞の初代培養細胞を作製し、これを用いて食品成分中の血管新生制御物質を探索し、制御機構の解明を行うことを目指した。

ラット肝臓の類洞壁内皮細胞の初代培養細胞を用いることを計画した理由は、初代培養細胞は生体の特性をよく維持していることに加え、この内皮細胞は VEGF 受容体を十分に発現し、VEGF に対し速やかに反応して増殖し VEGF 以外の増殖因子にほとんど反応しない性質をもつため、VEGF を標的とする制御物質の探索や制御機構の解明には適切と考えたためである。しかし、この細胞が VEGF に対して強い反応性を示すのは 1 週間以内であり、細胞の継代培養も難しく実験ごとに異なるラット個体から採取する細胞数や細胞の状態を一定にすることは検討課題が多過ぎたことから、以下に記載した探索法と制御効果の解析を行える細胞培養系を新たに検討することとした。

食品成分中に存在する血管新生の制御物質の探索には効率を高める観点から、簡便な評価法を採用することとし、マトリゲルを用いることとした。

(1) 食品成分中の血管新生制御物質の探索

96 ウェルプレート (Eppendorf 社) にマトリゲル (Cultrex Reduced Growth Factor Basement Membrane Extract, Trevigen 社) をコーティングした後、ヒト臍帯静脈血管内皮細胞 (Human Umbilical Vein Endothelial Cells; HUVEC, Kurabo 社) を播種して、37 °C、5% CO₂ インキュベーターで 16 時間培養した。

播種する HUVEC の細胞数が、最終的に観察するネットワークの形成に最も適切な細胞数となるよう、はじめに播種細胞数の検討を行った。

ネットワークを形成させる際の培養液は、無血清、HUVEC の増殖因子は無添加の基礎培地 (HuMedia-EB2, Kurabo 社) を用い、基礎培地のみをコントロールとし、ポジティブコントロール (血管新生促進) に 15ng/mL VEGF (VEGF-A₁₆₅, Wako 社) を、ネガティブコントロール (血管新生抑制) に 15μM Sulforaphane (Trevigen 社) を基礎培地に添加し、同様に種々の濃度の試料溶液を基礎培地に添加し探索を行った。

培養終了後、-20 °C で氷冷したメタノールで固定、洗浄、形成されたネットワークを染色溶液 (Trevigen 社) で染色し、光学顕微鏡 (倍率 ×40) で観察した。

この探索の結果、血管新生を制御する機能をもつことが判明した物質について、さらに以下で検討した共培養系を用いた評価法により制御効果を定量化することとした。

(2) 共培養系による血管新生制御効果の評価法の検討

In vivo での血管新生の状態をよく反映する *in vitro* の評価法として、HUVEC と正常ヒト皮膚線維芽細胞 (Normal Human Dermal Fibroblasts; NHDF, Kurabo 社) との共培養系を作製し、形成される細管を定量化することを検討した。

24 ウェルプレート (Corning 社) を用いて、まず共培養に供する両細胞の播種細胞数、播種比率、評価試験用培地の成分および培養用培地を評価試験用培地と交換する時期、細管の形成を判定するまでの培養日数の検討を行った。

さらに、形成された細管の可視化は -20 で氷冷した 70% エタノールで固定した後、酵素抗体法にて行ったが、1 次染色として用いた血管内皮細胞マーカーである血小板/内皮細胞接着分子-1 (CD31, PECAM-1) モノクローナル抗体 (マウス抗ヒト CD31, Sigma-Aldrich 社) の最適なクローン番号の検討を行った。

2 次染色はアルカリフォスファターゼ標識ヤギ抗マウス IgG H&L (Abcam 社) で行い、5-bromo-4-chloro-3-indolylphosphate/Nitro blue tetrazolium (BCIP/NBT, Sigma-Aldrich 社) で発色させ、染色された細管のデジタル画像を既存の解析ソフトにより 2 値化し、細管の長さ、分岐点数、枝数、面積の定量化を検討した。

評価試験用培地は、試験用培地のみのもをコントロールとし、ポジティブコントロール (血管新生促進) に 15ng/mL の VEGF (VEGF-A₁₆₅, Wako 社) を、ネガティブコントロール (血管新生抑制) に 20 μ M の Suramin (Suramin sodium, Wako 社) を、(1) で得られた濃度の試料溶液を試験用培地に添加し、培養終了時まで隔日で、それぞれの培地交換を行った。一連の培養は 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ インキュベーターで行った。

4. 研究成果

研究の方法 (1) に記載した血管新生制御物質の簡便な探索法における HUVEC の適切な播種細胞数は検討の結果、6 ~ 7 \times 10⁴ cells/well であった。

この細胞数を播種し、研究の方法 (1) に従って食品成分中の物質を探索した結果を図 1~4 に示した。

図 1 は基礎培地のみ、図 2 は基礎培地に VEGF を添加、図 3 は 200 μ g/mL の試料溶液を添加、図 4 は Sulforaphane を添加して培養した結果である。

図 3 は図 2 と同様、図 1 と比較するとネットワークが有意に多く形成されており、探索で得られた物質は当初予測していた血管新生の抑制作用ではなく、促進作用をもつ物質であることが明らかになった (n=4)。

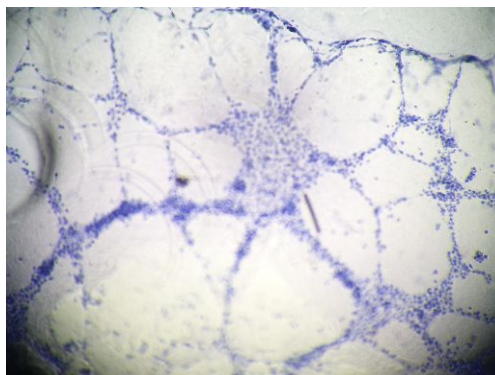


図 1 基礎培地のみで培養 (倍率: \times 40)

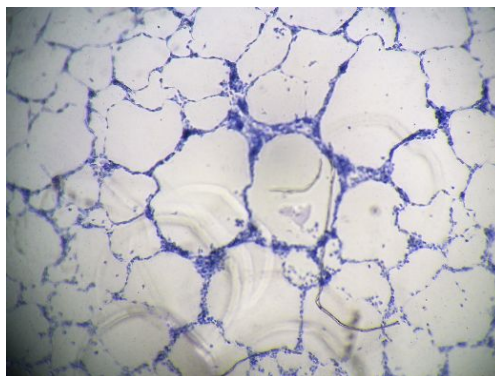


図 2 基礎培地に 15ng/mL VEGF を添加して培養 (倍率: \times 40)

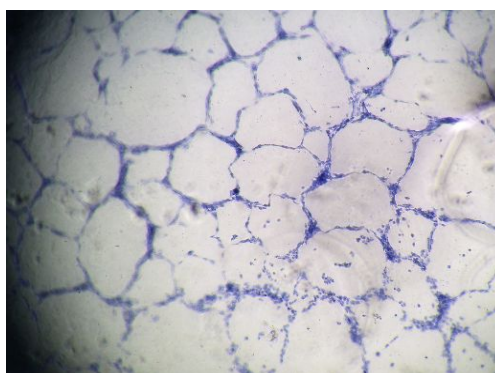


図 3 基礎培地に 200 μ g/mL 試料溶液を添加して培養 (倍率: \times 40)

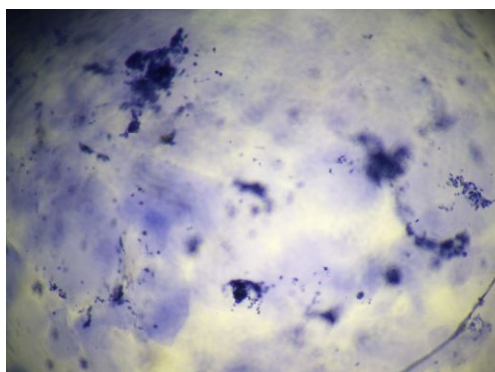


図 4 基礎培地に 15 μ M Sulforaphane を添加して培養 (倍率: \times 40)

この物質を研究の方法(2)に記載した共培養系による評価法に供した。

共培養系による評価法に適した HUVEC と NHDF の播種細胞数と播種比率を検討した結果、播種細胞数は 1×10^5 cells/well、播種比率は HUVEC:NHDF 1:2 であった。

共培養を開始して 14 日目に、形成された細管を研究の方法(2)に従って染色し定量化を試みた。

14 日間の共培養で用いる培地の検討を行い、共培養開始後 2 日間は HUVEC の培養用培地 (HuMedia-EB2 に増殖添加剤を加えた HuMedia-EG2, Kurabo 社) で培養し、3 日目にこの培養用培地に含まれる線維芽細胞増殖因子 (Fibroblast Growth Factors; FGF, Kurabo 社) を除いた試験用培地に交換することとした。以降、各 well の培地は、試験用培地のみ試験用培地に VEGF を添加 試験用培地に 200 μ g/mL 試料溶液を添加 試験用培地に Suramin を添加したものとした。

1 次染色に用いた CD31 モノクローナル抗体のクローン番号の検討をした結果、クローン番号 59 は非特異的染色がほとんどないことが明らかになった。

以上の培養条件、染色条件の検討で得た条件に従って、(1)の方法で得られた物質を評価したところ、試験用培地で培養した共培養細胞で形成された細管のデジタル画像については、解析ソフトによる 2 値化により定量化ができたが、そのほかの試験用培地で培養した共培養細胞のデジタル画像については明確な定量化ができなかった。ただし、記録したデジタル画像上では、で形成された細管の染色結果には差違が認められた。

の 200 μ g/mL 試料溶液を添加した試験用培地で培養した共培養細胞で形成された細管の染色結果は、試験用培地のみで培養した場合に比べわずかながら細管の長さ、分岐点数、枝数が上回り、の Suramin を添加した試験用培地で培養した結果は染色された細管はほとんど認められなかった。

これらの結果から、探索で得られた食品成分中の物質は血管新生を抑制する作用ではなく、促進する作用をもつ物質であることが明らかになったが、促進効果を定量化するには至らなかった。

明確な定量結果を得るためには、共培養の過程で培養用培地を試験用培地に交換する時期と試験用培地の成分の検討をさらに行う必要があると考えられる。

食品成分中の物質の探索で得られた本物質は、糖質摂取を抑制することが可能なことから、生活習慣病につながる肥満の予防や改善に有効な物質として、近年、健康産業や食品産業で注目を集めているが、本物質が血管新生を促進する作用を有することはこれまで国内外において報告がない。

血管新生を促進する作用をもつ物質は、創傷治癒および脳梗塞、心筋梗塞の際に生じる

副側血行路(血管バイパス)の形成を促進させる効果をもたらす可能性があり、本物質は血管再生療法の一助として医療分野において新たな展開が期待できると考えられる。

<引用文献>

1. 松村 敬一郎, 小國 伊太郎, 伊勢村 護, 杉山 公男, 山本(前田)万里編, 茶の機能-生体機能の新たな可能性-, 学会出版センター, 2002 年.
2. Kubota K, *Jpn. Soc. Nutr. Food Sci.*, **53**, 163-167, 2000.
3. Nishida S, Tsuchida K & Satoh H, *Folia Pharmacol. Jpn.*, **146**, 140-143, 2015.
4. Findlay JK, *J. Endocrinol.*, **111**, 357-366, 1986.
5. Folkman J & Klagsbrun M, *Science*, **235**, 442-447, 1987.
6. Asprunk DH & Folkman J, *Microvasc. Res.*, **14**, 53-65, 1977.
7. Klagsbrun M & D'Amore PA, *Ann. Rev. Physiol.*, **53**, 217-239, 1991.
8. Marconcini L, Marchio S, Morbidelli L *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 9671-9676, 1999.
9. Ferrara N & Davis-Smyth T, *Endocr. Rev.*, **18**, 4-25, 1997.
10. Shibuya M, Ito N & Claesson-Welsh L, *Curr. Topics Microbiol. Immunol.*, **237**, 59-83, 1999.
11. Takahashi T, Yamaguchi S, Chida K & Shibuya M, *EMBO J.*, **20**, 2768-2778, 2001.
12. Shibuya M, *Biol. Chem.*, **383**, 1573-1579, 2002.
13. Shibuya M, *Cancer Sci.*, **94**, 751-756, 2003.
14. Tanaka K, Sato M, Tomita Y & Ichihara A, *J. Biochem.*, **84**, 937-946, 1978.
15. Cudmore M, Ahmad S, Al-Ani B. *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **345**, 1275-1282, 2006.
16. Kane R, Godson C & O'Brien C, *Mol. Vis.*, **14**, 1138-1148, 2008.

5. 主な発表論文等

6. 研究組織

(1)研究代表者

山野 春子 (YAMANO, Haruko)

上武大学・医学生理学研究所・客員研究員

研究者番号：90242338