

機関番号：25301

研究種目：基盤研究<sup>◎</sup>

研究期間：2008～2010

課題番号：20500713

研究課題名（和文） グアバ茶による新しい動脈硬化予防法の開発に向けた研究

研究課題名（英文） Study for the development of a novel treatment to prevent atherosclerosis with guava tea

研究代表者

高橋 吉孝 (TAKAHASHI YOSHITAKA)

岡山県立大学・保健福祉学部・教授

研究者番号：10236333

研究成果の概要（和文）：低比重リポタンパク（LDL）の酸化はアテローム性動脈硬化の引き金の一つとして働くが、この過程に白血球型 12-リポキシゲナーゼが重要な役割を果たしていることが知られている。本研究でグアバ葉抽出物がこの酵素を阻害すること、酵素過剰発現細胞による LDL 酸化を抑制すること、またマウスに経口投与すると動脈硬化が予防されることを証明した。さらに、抽出物中の主な本酵素阻害成分としてケルセチンとエチルガレートを同定した。

研究成果の概要（英文）：Oxidative modification of low density lipoprotein (LDL) is one of the critical steps for the development of atherosclerosis and leukocyte-type 12-lipoxygenase has been suggested to play an essential role in this process. In this study, we demonstrated that guava leaf extracts inhibited not only the leukocyte-type 12-lipoxygenase activity but also LDL oxidation mediated by the enzyme-overexpressing J774A.1 cells. Oral administration of guava leaf extracts to apo E-knockout mice significantly reduced the area of atherogenic lesions developed in the aorta and aortic sinus. The major components inhibiting leukocyte-type 12-lipoxygenase contained in guava leaf extracts were identified as ethyl gallate and quercetin.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2009年度	900,000	270,000	1,170,000
2010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：脂質生化学

科研費の分科・細目：生活科学・食生活学

キーワード：12-リポキシゲナーゼ、アラキドン酸、酸化 LDL、動脈硬化、グアバポリフェノール、グアバ葉

## 1. 研究開始当初の背景

虚血性心疾患や脳血管障害などの危険因子として重要な生活習慣病の一つである動脈硬化症は、我が国における食習慣の変化や高齢人口の増加に伴って大きな社会問題になって

いる。しかしながら、その対策としては高脂血症治療薬による予防や、原疾患となる糖尿病や肥満などへの治療が行われているのみで、動脈硬化の進行自体を直接抑制する方法というのは現在まで確立されていない。

高脂血症の中でも低比重リポ蛋白 (LDL) の上昇は、動脈硬化発症の重要な原因の一つであるが、LDL は、酸化修飾を受けることにより、初めて動脈硬化原性を持つようになる。すなわち、酸化 LDL は血管内膜に存在するマクロファージのスカベンジャー受容体を介して無制限に取り込まれ泡沫細胞となり、粥状硬化巣形成の引き金となるが、未酸化の LDL はスカベンジャー受容体では認識されない。したがって、LDL の酸化を抑制できれば高 LDL 血症による動脈硬化を抑制することができると考えられる。

白血球型 12-リポキシゲナーゼ (12-LOX) は、不飽和脂肪酸に分子状酸素を添加して過酸化脂質を生成する酵素である。この酵素は、動脈硬化巣に多数集簇しているマクロファージに大量に発現しており、LDL 中のエステル型脂肪酸にも直接酸素を添加する性質がある。そこで申請者は、この酵素の過剰発現細胞を樹立し、これを利用してマクロファージに発現している白血球型 12-LOX が LDL の酸化修飾に必須の酵素であることを明らかにした。また「細胞外」の LDL が「細胞内」の白血球型 12-LOX により酸素添加を受けるための細胞表面の受容体として、LDL 受容体関連蛋白 (LRP) を同定したが、その研究の中で、白血球型 12-LOX の阻害により、細胞外の LDL の酸化が非常に効率よく抑制されることを発見した。実際、白血球型 12-LOX のノックアウトマウスでは動脈硬化の進展が抑えられることが、アメリカの研究グループにより報告されている。従って、12/15-LOX の働きを抑制できれば高 LDL 血症による動脈硬化の発症を予防できることは十分に期待される。

グアバ葉は各種ポリフェノールを豊富に含み、これを加工したグアバ茶やその抽出物は抗糖尿病効果、抗アレルギー効果、美白効果、抗酸化作用などをもつ健康食品として市場に出回っている。申請者はこの中で、グアバ葉から抽出したポリフェノール画分が抗酸化作用を持つことに着目し、脂肪酸への酸素添加酵素の一つであり、炎症に重要な役割を

果たすシクロオキシゲナーゼを阻害することを見出した。実際、このグアバ葉由来ポリフェノール画分は、ラットへの経口投与により抗炎症作用を有することも確認された。この画分の存在下で、同じく脂肪酸への酸素添加酵素である白血球型 12-LOX 反応を行わせたところ、シクロオキシゲナーゼに対するのと同程度以上の効率で反応が阻害されることが見出された。

## 2. 研究の目的

グアバ茶に含まれるポリフェノールの動脈硬化予防効果を証明するために、本研究は次の3点を明らかにすることを目的として行った。

- (1) 早期より動脈硬化を発症する apoE ノックアウトマウスにグアバポリフェノールを投与して、動脈硬化の発症がどの程度抑制されるかどうかを定量的に明らかにする。
- (2) 白血球型 12-LOX 過剰発現細胞をグアバポリフェノールで処理し、細胞による LDL の酸化が抑制されるかどうかを明らかにする。
- (3) グアバポリフェノール中に含まれる白血球型 12-LOX 阻害成分を同定し、その含有量を明らかにする。

## 3. 研究の方法

### (1) 酵素活性測定方法

グアバ葉より 50%エタノール抽出と疎水性クロマトグラフィーにより得たポリフェノールを 70%以上含む画分をグアバ葉抽出物として以下の実験に用いた。白血球型 12-LOX 過剰発現マウスマクロファージ由来 J774A.1 細胞の可溶性画分から硫酸分画により調製した部分精製酵素を、各種濃度のグアバ葉抽出物あるいはそこから精製した成分の存在下でアラキドン酸と 24°C で 5 分間反応させ、生成物を逆相の HPLC で分析して酵素活性を測定し、阻害剤非添加時の活性と比較した。

### (2) マウスにおける動脈硬化予防効果

apoE ノックアウトマウス (C57BL/6J) は日本チャールズリバーより購入し、25°C で 12 時間の明暗サイクル下で、日本クレアより購入した CE-2 を給餌して飼育した。4 週令の雄のマウス 10 匹を 2 群に分け、一方の群には 100mg/kg のグアバ葉抽出物を、もう一方には水を 16 週間経口投与した後、ペントバルビタール麻酔下で脱血死させ、大動脈起始部から総腸骨動脈分枝部までの血管を単離した。外膜の脂肪を完全に取除いてから血管の方向に開き、20%中性緩衝ホルマリン溶

液で固定した後、OilRed O で染色した。取り込んだ画像は Adobe Photoshop CS4 で分析し、染色部分の面積を動脈の面積全体で除した値を、両群で比較した。また、大動脈起始部の凍結切片を作成して同様に OilRed O で染色し、染色部分の面積を両群で比較した。

### (3) 白血球型 12-LOX 過剰発現細胞による LDL 酸化

白血球型 12-LOX 過剰発現マウスマクロファージ様 J774A.1 細胞を、50  $\mu\text{g/ml}$  のグアバ葉抽出物存在下で無血清の RPMI1640、中で 2 時間培養した後、健常人より調製した LDL を 400  $\mu\text{g/ml}$  となるよう加えて引き続き 12 時間培養した。培地より総脂質を抽出し、アルカリ加水分解を行ったものを逆相の HPLC で分析し、リノール酸酸化物のピーク面積を、内部標準として添加した 15-ヒドロキシエイコサジエン酸の面積と比較することにより酸化 LDL 量を定量した。

### (4) グアバ葉抽出物中の有効成分の分析

グアバ葉抽出物を、逆相 HPLC により 30-100%メタノールリニアグラジエント溶媒を用いて分画し、それぞれの画分の存在下で 12-LOX 活性を測定した。強力な阻害活性を認めた 2 つの画分より、逆相 HPLC を組み合わせて均一にまで阻害成分を精製した。一方はケルセチンであったが、もう一方は未同定であったため、高分解能マスマスペクトロメトリーとプロトン NMR により構造の推定を行った。

## 4. 研究成果

### (1) 白血球型 12-LOX 活性のグアバ葉抽出物による阻害

動脈硬化原因酵素である白血球型 12-LOX の部分精製酵素標品 (比活性 167  $\text{nmol}/5 \text{ min}/\text{mg}$  of protein) を各濃度のグアバ葉抽出物の存在下でアラキドン酸と反応させ、生成物を逆相の HPLC で分析したところ、生成される 12-ヒドロキシ酸 (12-HETE) および 15-ヒドロキシ酸の面積は量依存的に減少し、 $\text{IC}_{50}$  値は 20  $\mu\text{g/ml}$  であった (図 1)。

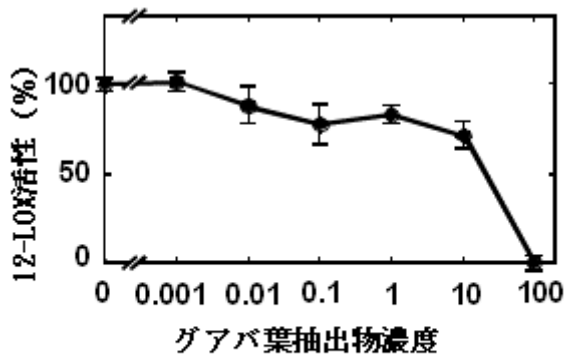


図1 グアバ葉抽出物による12/15-LOXの阻害

### (2) グアバ葉抽出物による細胞レベルでの酵素阻害

白血球型 12-LOX 発現細胞あるいはコントロールの Mock 細胞を 400  $\mu\text{g/ml}$  の LDL 存在下で 37  $^{\circ}\text{C}$  で 12 時間インキュベーションし、培養液中の生成物を還元後、アルカリ加水分解し、逆相の HPLC で分析した。白血球型 12-LOX 過剰発現細胞より回収した培養液中には、酸化 LDL に由来するヒドロキシオクタデカリノール酸 (HODE) と溶出時間が一致するピークが観察された。内部標準との面積の比較により生成物の量を計算したところ、 $2.2 \pm 0.1 \text{ nmolHODE}/12\text{h}/\text{mg LDL}$  ( $n = 3$ ) であり、Mock 細胞とのインキュベーションで生成された  $0.5 \pm 0.03 \text{ nmolHODE}/12\text{h}/\text{mg LDL}$  ( $n = 3$ ) と比較して有意に多かった ( $p < 0.01$ ) (図 2)。

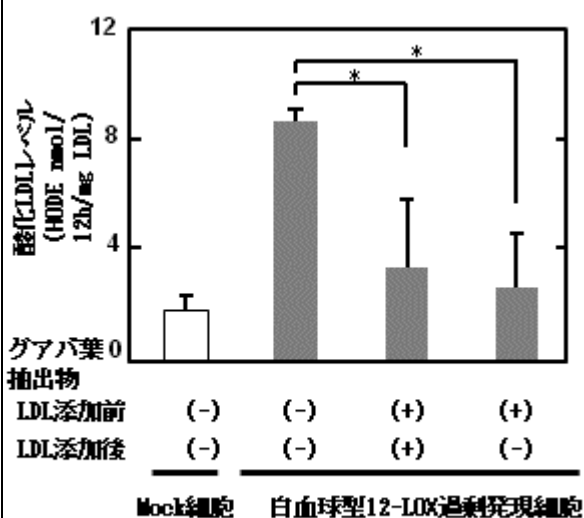


図2 グアバ葉抽出物によるLDL酸化の阻害

白血球型 12-LOX 過剰発現細胞を 50  $\mu\text{g/ml}$  のグアバ葉抽出物存在下で 2 時間プレインキュベーションを行った後、培地に 400  $\mu\text{g/ml}$  の LDL を添加して 37 $^{\circ}\text{C}$  で 12 時間インキュベーションしたところ、酸化 LDL に由来する HODE の生成量は  $1.5 \pm 0.4 \text{ nmolHODE}/12\text{h}/\text{mg LDL}$  ( $n = 3$ ) となり、グアバ葉抽出物により LDL の酸化が有意に抑制されることが示された ( $p < 0.05$ )。これがグアバフェノン II による白血球型 12-LOX の阻害によるのか、グアバ葉抽出物に含まれるポリフェノールによる非特異的な抗酸化作用によるのか調べるために、グアバ葉抽出物と細胞を 2 時間プレインキュベーションした後、培地からグアバ葉抽出物を除去してから LDL を添加し、12 時間インキュベーションしたところ、酸化 LDL に由来する HODE の生成量は  $1.1 \pm 0.3 \text{ nmolHODE}/12\text{h}/\text{mg LDL}$  ( $n = 3$ ) と、依然としてグアバフェノン II 非存在下での細胞と比べて有意に低く ( $p < 0.01$ )、グアバ葉抽出物

による LDL の酸化抑制は酵素阻害による可能性が示唆された (図 2)。

### (3) グアバ葉抽出物による動脈硬化の抑制

白血球型 12-LOX を阻害する成分を含むグアバ葉抽出物が実際に動脈硬化を抑制するかどうかを検討するために、4 週齢の雄の野生型マウスおよび apoE ノックアウトマウスに 100 mg/kg 体重のグアバ葉抽出物または水を週 5 日間で 16 週間経口投与し、20 週齢で大動脈起始部から両側総腸骨動脈分岐部までを摘出後、展開標本として脂質を Oil red O で染色した。野生型マウスでは Oil red O による染色部は全く観察されず、動脈硬化の進行がみられないことが確認された。一方、apoE ノックアウトマウスの水投与群では Oil red O で染色された病変部が大動脈全体の面積の  $2.2 \pm 0.4\%$  ( $n = 5$ ) を占めており、動脈硬化の進行が観察された。グアバ葉抽出物投与群では Oil red O で染色された病変部の面積は大動脈全体の  $1.1 \pm 0.3\%$  ( $n = 5$ ) であり、水投与群と比較して有意に減少していた ( $p < 0.01$ ) (図 3)。同様の結果は、大動脈起始部の切片を作成し、Oil red O 染色を行った標本でも観察された。

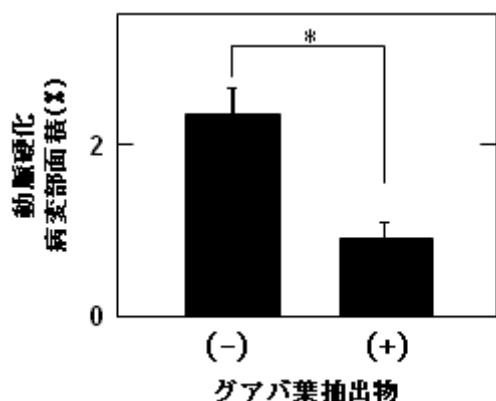


図 3 グアバ葉抽出物による動脈硬化の抑制

### (4) グアバ葉抽出物中に含まれる有効成分の単離と同定

グアバ葉抽出物を逆相 HPLC によりメタノール 30% から 100% のリニアグラジエントにより分画し、2 ml ずつ分取した。それぞれの画分の存在下において、部分精製した白血球型 12-LOX とアラキドン酸を反応させ、生成物を逆相の HPLC で分析したところ、画分 12-14 分と 22-24 分でそれぞれ酵素活性が 99%、90% の阻害が観察された。これらの画分を同じカラムを用いて再度アイソクラティックで分析し、280 あるいは 365 nm の吸光度を連続的に追跡することにより 12-14 分の画分からは 15.4 分、21.3 分、23.4 分、

22-24 分の画分からは 27.5 分、29.7 分、31.5 分の 3 本ずつのピークが観察されたのでこれらに分取した。部分精製した白血球型 12-LOX を分取したこれらのピークの存在下でアラキドン酸と反応させたところ、酵素活性は、12-14 分の画分のピークで 14% (15.4 分)、11% (21.3 分)、54% (23.4 分) 阻害され、22-24 分の画分のピークで 22% (27.5 分)、15% (29.7 分)、24% (31.5 分) 阻害された。22-24 分の画分のうち 31.5 分に溶出されたピークはケルセチンの溶出時間と一致し、スペクトルの極大吸収が 364.4 nm、254.5 nm に見られケルセチンのスペクトルと一致したことからケルセチンと同定した。4-6 分と 12-14 分の画分はケルセチン-3-グルコシドを含むいずれの既知の成分とも溶出時間は一致しなかった。12-14 分の画分のうち 23.4 分に抽出されたピークはケルセチンよりも強い阻害効果を示しており、Photodiode Array により 214.3 nm と 272.3 nm に波長の吸収極大がある物質であることが確認できた。この成分を大量に分取し、2 種類の条件で逆相 HPLC により分析したところ、いずれの分析条件においても単一ピークであることが確認された。この化合物の吸収スペクトルを分析したところ、化合物の吸収極大は 272 nm であった。高分解能 ESI-MS を用いて陰イオンモードで本成分を分析したところ、イオンの分子量 197.04477、組成式は  $C_9H_9O_5$  と推測された。これが  $[M-H]^-$  を観測したと考え、本化合物の組成式は  $C_9H_{10}O_5$  であると推測した。 $^1H$ -NMR 解析により、シグナルを帰属すると、本化合物はエチルガレートであることが示唆され、標準品とクロマトしたことから、エチルガレートと同定した。本成分は白血球型 12-LOX のほか血小板型 12-LOX、5-LOX も濃度依存的に阻害し、その  $IC_{50}$  はそれぞれ  $0.25 \mu M$ 、 $0.52 \mu M$ 、 $5.7 \mu M$  であった。一方、COX-1 と COX-2 は阻害されなかった。

以上のように、本研究により食品であるグアバ葉抽出物に抗動脈硬化という新規の機能性を見出し、有効成分として 2 種類の化合物を同定した。今後は、本食品ならびにその成分について、ヒトにおける有効性の検討を進め、新規の抗動脈硬化性機能性食品としての開発を進めていく予定である。

### 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 6 件)

1. Kunimoto A, Yokoro M, Murota K, Yamanishi R, Suzuki-Yamamoto T, Suzuki M, Yutani C, Doi S, Hiemori M, Yamashita H,

Takahashi Y, Tsuji H, and Kimoto M. 2011 Gastrointestinal Digestion and Absorption of Pen j 1, a Major Allergen from Kuruma Prawn, *Penaeus japonicas*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* in press, 2011.

2. Kawakami Y, Yamashita C, Kashiwase Y, Morinaka T, Suzuki-Yamamoto T, Yamashita H, Kimoto M, Tsuji H, Kurahashi Y, Daiyasu H, Toh H, Sugahara M, Miyano M, Yamamoto S, Takahashi Y. Functional expression of single-chain antibody to leukotriene C(4). *Biochem Biophys Res Commun.* 392: 421-425, 2010.

3. Nobuko Komiyama, Miki Hiemori, Masumi Kimoto, Makiko Suzuki, Hiromi Yamashita, Yoshitaka Takahashi and Hideaki Tsuji. Preparation and epitope mapping of a monoclonal antibody against Tri a Bd 27K, a wheat major allergen. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 73: 2113-2116, 2009.

4. Kawakami Y, Kubota N, Ekuni N, Suzuki-Yamamoto T, Kimoto M, Yamashita H, Tsuji H, Yoshimoto T, Jisaka M, Tanaka J, Fujimura HF, Miwa Y, Takahashi Y. Tumor-suppressive lipoxygenases inhibit the expression of c-myc mRNA coding region determinant-binding protein/insulin-like growth factor II mRNA-binding protein 1 in human prostate carcinoma PC-3 cells. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 73: 1811-1817, 2009.

5. Kawakami Y, Nakamura T, Hosokawa T, Suzuki-Yamamoto T, Yamashita H, Kimoto M, Tsuji H, Yoshida H, Hada H, Takahashi Y. Antiproliferative activity of guava leaf extract via inhibition of prostaglandin endoperoxide H synthase isoforms. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids.* 80: 239-245, 2009.

6. Yamashita H, Maruta H, Jozuka M, Kimura R, Iwabuchi H, Yamato M, Saito T, Fujisawa K, Takahashi Y, Kimoto M, Hiemori M, Tsuji H. Effects of acetate on lipid metabolism in muscles and adipose tissues of type 2 diabetic Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF) rats *Biosci Biotechnol Biochem.* 73: 570-6, 2009.

[学会発表] (計 48 件)

1. 川上祐生, グァバ葉抽出物に含まれる没

食子酸エチルによる白血球型 12-リポキシゲナーゼ阻害, 第 65 回日本栄養・食糧学会, 2011.5, 東京

2. 高橋吉孝, 動脈硬化ならびに関連疾患の予防法確立を目指した研究, OPU フォーラム 2011, 2011.5, 岡山

3. 川上祐生, 抗ロイコトリエンモノクローナル抗体の構造解析に関する研究, OPU フォーラム 2011, 2011.5, 岡山

4. Takahashi Y. Identification of leukocyte-type 12-lipoxygenase inhibitor in guava leaf extract. Bioactive Okayama 2010 International Conference on Biologically-Active Substances. 2010.8, Okayama.

5. Kawakami Y. Functional expression and site-directed mutagenesis of single-chain antibody to leukotrienin C4. Bioactive Okayama 2010 International Conference on Biologically-Active Substances. 2010.8, Okayama.

6. 川上祐生, 抗ロイコトリエンC4単鎖抗体のNusA 融合タンパク質としての発現とロイコトリエン中和作用, 第83回日本生化学会大会・第33回日本分子生物学会年会・合同大会, 2010.12, 神戸

7. 川上祐生, 大豆イソフラボンのシクロオキシゲナーゼ活性調節作用に関する研究, 第52回日本脂質生化学会, 2010.6, 伊香保

8. 高橋吉孝, 生活習慣病の早期発見と予防に向けた研究, OPUフォーラム2010, 2010.5, 岡山

9. 川上祐生, 気管支喘息の改善を目指した抗ロイコトリエン抗体に関する研究, OPUフォーラム2010, 2010.5, 岡山

10. 川上祐生, 大豆イソフラボンのシクロオキシゲナーゼ活性調節作用に関する研究, 不二たん白質研究振興財団第13回研究報告会, 2010.5, 大阪

11. Kawakami Y. Induction of low density lipoprotein receptor in HepG2 cells by tocotrienols. Fifth Woosong University-Okayama Prefectural University Joint Conference on Nutrition. 2009.9, Chengdu, China

12. Kawakami Y. Effect of guava leaf

extract on leukocyte-type 12-lipoxygenase activity. The 1st International Conference on Lipid Hydroperoxide Biology and Medicine Sendai. 2009.11, Sendai

13. 高橋吉孝, 脂質異常症の病態, 21年度岡山県栄養士会生涯学習研修会講演, 2009.9, 岡山

14. 川上祐生, 部位特異的変異体を用いた抗ロイコトリエンC4モノクローナル抗体の抗原認識部位の解析, 2009.7, 名古屋

15. 川上祐生, 抗ロイコトリエンC4抗体の単鎖抗体による発現, OPUフォーラム2009, 2009.5, 岡山

16. 川上祐生, 白血球型12-リポキシゲナーゼに対するグアバ葉抽出物の阻害効果, 第63回日本栄養・食糧学会大会, 2009.5, 長崎

17. 川上祐生, 大豆イソフラボンのシクロオキシゲナーゼ活性阻害作用, 日本農芸化学会2009年度大会, 2009.3, 福岡

18. 川上祐生, 炎症の予防・改善を可能にするグアバ葉抽出物の開発, 第13回岡山リサーチパーク研究・展示発表会, 2009.1, 岡山

19. 川上祐生, グアバ葉抽出物による白血球型12-リポキシゲナーゼの阻害, 第31回日本分子生物学会年回・第81回日本生化学会大会合同大会 2008, 12, 神戸

20. Kawakami Y. cDNA Cloning and Expression of a Mouse Anti-LTC4 Monoclonal Antibody. Fourth Woosong University-Okayama Prefectural University Joint Conference on Nutrition. 2008.9, Daejeon, Korea

21. 川上祐生, 抗ロイコトリエンC4モノクローナル抗体のcDNAクローニングと発現, 第50回日本脂質生化学会, 2008.5, 徳島

22. 高橋吉孝, ポリフェノールの生活習慣病予防への応用を目指したアラキドン酸代謝に関する基礎研究, 第4回「酢の機能性活用コンソーシアム」研究発表・セミナー, 2008.3, 岡山

23. 川上祐生, グアバ葉ポリフェノールの抗炎症効果, 日本農芸化学学会主催 2008年度大会, 2008.3, 名古屋

ほか25件

〔図書〕(計2件)

1. 高橋吉孝, 朝倉書店, エイコサノイドと関連化合物 (1) 生合成と生理作用 (中野・ほか編, ビタミン総合辞典, pp471-475), 2010

2. 高橋吉孝・辻英明編, 講談社サイエンティフィック, 栄養科学シリーズ NEXT 「基礎有機化学」, 2010, 148 ページ

〔産業財産権〕

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高橋 吉孝 (TAKAHASHI YOSHITAKA)  
岡山県立大学・保健福祉学部・教授  
研究者番号: 10236333

(2) 研究分担者

川上 祐生 (KAWAKAMI YUKI)  
岡山県立大学・保健福祉学部・助教  
研究者番号: 30453202