

機関番号：45302

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009 ~ 2010

課題番号：21700756

研究課題名(和文) ローズマリー由来酸化ストレス防御活性化成分の新規機能に関する研究

研究課題名(英文) The novel effect of polyphenolic diterpene in rosemary, activating oxidative stress sensor

研究代表者 萱島 知子 (Tomoko Kayashima)

就実短期大学 生活科学科 講師

研究者番号：90452599

## 研究成果の概要(和文):

本研究では生体における酸化ストレス防御に関する因子を活性化するローズマリー由来成分カルノシン酸の新規機能を検討した。カルノシン酸はラット動脈片を用いた *ex vivo* 血管新生モデルにおいて微小血管成長を抑制した。さらにヒト臍帯静脈由来血管内皮細胞における管腔形成、細胞増殖、細胞遊走も抑制した。以上より、カルノシン酸は血管新生抑制効果を示し、酸化ストレスや血管新生が関与する疾病の予防・治療に有効である可能性が示された。

## 研究成果の概要(英文):

In this study, the effect of carnosic acid (CA) activating Keap1/Nrf2 pathway, a polyphenolic diterpene in rosemary, on angiogenesis was examined. CA suppressed microvessel outgrowth in an *ex vivo* serum-free matrix culture model using a rat aortic. The antiangiogenic effect of CA was shown in angiogenesis models using human umbilical vein endothelial cells with regard to tube formation on reconstituted basement membrane, proliferation and chemotaxis. These results suggest that CA may be useful for prevention and treatment of angiogenesis-dependent disorders.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,000,000	600,000	2,600,000

研究分野：生活科学

科研費の分科・細目：食生活学

キーワード：カルノシン酸、抗酸化、血管新生、血管内皮細胞、ローズマリー

## 1. 研究開始当初の背景

生体内には酸化ストレスに対する防御機能が備わっており、酸化ストレスから生体を守っている。近年、生体内の酸化ストレス防御系について分子レベルで解明が進み、その重要なターゲット物質として Nrf2 (nuclear factor erythroid 2 related factor 2) が

注目されている<sup>1)</sup>。この Nrf2 は、ヘムオキシゲナーゼ 1 やグルタチオン S 転フェラーゼといった生体防御関連遺伝子群の転写発現を誘導し、酸化ストレスに対し防御的に働く。活性酸素などの酸化ストレスが各種疾病の発生に関与していることはよく知られていることから、Nrf2 を活性化する因子は酸

化ストレス防御活性化物質として疾病予防や治療に役立つと考えられる。これまで Nrf2 活性化物質としては、いくつかの成分が報告されている。食品由来の Nrf2 活性化成分としては、スルフォラファン、クルクミン、茶カテキンが知られており、最近ではローズマリー由来のカルノシン酸 (Carnosic acid)<sup>2)</sup> が注目されている。

血管新生とは、既存の血管から新しい血管を形成する現象で、がんや糖尿病、肥満をはじめとする生活習慣病に関連した疾病等や認知症など現代社会で深刻化している疾病等の発症・進行に深く関与している。食品に含まれる血管新生抑制物質は健康に役立つ有効な機能成分の一つとして認識されている。最近、申請者らは、Nrf2 を活性する食品機能成分であるカルノシン酸が血管新生抑制作用を有する可能性を見出した。興味深いことに、カルノシン酸以外の食品由来の Nrf2 活性化物質も血管新生抑制作用を有することが報告されている。Nrf2 活性化作用を有し、かつ血管新生を抑制する食品機能成分は、様々な疾病予防に有用である可能性が極めて高い。従って、申請者が見出した Nrf2 活性化作用を有し、血管新生を抑制するローズマリー由来の食品成分カルノシン酸について、その作用機序を明らかにし疾病モデルでの評価を行うことは、実際の食生活での応用を考える上で重要である。

## 2. 研究の目的

現代社会で増加している疾病の発症には、酸化ストレスによる細胞や DNA・タンパク質などの損傷と血管新生による病態悪化が深く関与していることが明らかとなっている。このことから、生体の酸化ストレス防御系の活性化と血管新生抑制を有する食品機能成分は、様々な疾病の発症予防に役立つ可能性が高い。そこで、本研究では、食品由来の Nrf2 活性化成分の血管新生抑制の作用機序解明と病態モデルでの有効性について検討し、実際の食生活での活用に役立つ情報を得ることを目的とした。

本研究ではローズマリー由来の食品成分であるカルノシン酸に注目して実験を進めた。カルノシン酸は血管新生抑制作用を発揮した 100  $\mu$ M 程度でも神経細胞に有害な影響を与えないことが報告されており<sup>2)</sup>、機能成分として安全性が高い。カルノシン酸は脳の神経細胞保護作用が知られており、高齢化社会で増加する認知症の予防成分としても注目を集め始めている<sup>2)</sup>。認知症やアルツハイマー病患者の脳では血管新生が亢進しており、血管新生抑制作用を有する薬剤により発症が抑えられることも知られている<sup>3)</sup>。従って、カルノシン酸の酸化ストレス防御系活性化と血管新生抑制作用による脳細胞保護に

も関連性が推察され、より有効な機能成分となりうると考えられる。

## 3. 研究の方法

(1) 血管新生抑制効果は、ラット動脈片をコラーゲンゲル中で 3 次元培養する方法により検討した。ウイスター系ラット (オス、約 6 週齢、体重約 200 g) をエーテル麻酔下で屠殺し、無菌的に胸部動脈を取り出した。RPMI 1640 培地中で血液等を除き、1-1.5 mm の長さに切った血管片を 6 ウェルプレートに置き、コラーゲン溶液 (Type I コラーゲン : 10  $\times$  DMEM 培地 : 再構成緩衝液 = 8 : 1 : 1) で包埋した。コラーゲンを十分にゲル化させた後、1% ITS+ を含む 2 ml の RPMI 1640 を加え、カルノシン酸またはカルノソール (Carnosol) を添加した。カルノソールはカルノシン酸と同じくローズマリーに含まれるポリフェニルテルペノイドである。培養は CO<sub>2</sub> インキュベーター中で 7 日間行い、血管片の端から生じた微小血管長を測定し、検討した。

(2) 血管新生抑制作用を明らかにするために、ヒト臍帯静脈由来血管内皮細胞 (Human Umbilical Vein Endothelial Cells : HUVECs) を用いて検討した。血管新生の主要な過程である管腔形成、細胞増殖、増殖因子による遊走に対する影響を検討した。

血管内皮細胞の管腔形成実験は、マトリゲルを 96 ウェルプレートの底に入れ、37 で十分にゲル化させた後、カルノシン酸またはカルノソールを含む血管内皮細胞増殖培地 HuMedia EG-2 (クラボウ) に懸濁した血管内皮細胞 (1  $\times$  10<sup>5</sup> cells/ml) 溶液を 100  $\mu$ l 加えた。CO<sub>2</sub> インキュベーター中で 12 時間培養した後、倒立顕微鏡下で形成された管腔を撮影し、一定面積中の管腔の長さを測定した。

血管内皮細胞増殖実験は、96 ウェルプレートの各ウェルに、血管内皮細胞増殖培地に懸濁した血管内皮細胞 (1.5  $\times$  10<sup>4</sup> cells/ml) 溶液を 100  $\mu$ l 加えた。一晚 CO<sub>2</sub> インキュベーター中で培養して、細胞をプレートに付着させた後、カルノシン酸またはカルノソールを含む血管内皮細胞増殖培地 (HuMedia EG-2) に交換して、CO<sub>2</sub> インキュベーター中で 72 時間培養した。培地をサンプルを含まない血管内皮細胞増殖培地に交換後、WST-1 試薬 (Dojin) を 10  $\mu$ l 加え、マイクロプレートリーダー (BIO-RAD) で 450 nm の吸光度を測定し、細胞数を計測した。

血管内皮細胞の遊走実験は、次の通り行った。24 ウェルプレートの各プレートに、最終濃度 10 ng/ml の血管内皮増殖因子 (Vascular Endothelial Growth Factor : VEGF) を含む M199 培地 (0.1 % 牛血清アルブミンを含む) 400  $\mu$ l を加えた。膜のポアサイズが 8  $\mu$ m のトランスウェルを 0.1 %ゼラチンでコート

し、カルノシン酸またはカルノソールを含む M199 培地 (0.1 % 牛血清アルブミン、BSA を含む) に懸濁した血管内皮細胞 (2.5 × 10<sup>5</sup> cells/ml) 溶液 400 μl を入れた。トランスウェルを 24 ウェルプレートにウェルに入れ、CO<sub>2</sub> インキュベーター中で 6 時間培養した。トランスウェル膜の表側に残っている血管内皮細胞を綿棒で取り除いた後、裏側に移動してきた血管内皮細胞を Diff-Quick 染色キットを用いて染色し、顕微鏡下で細胞数を計測した。

(3) カルノシン酸の機能成分としての有効性を個体レベルでの評価をする手がかりを得るために、卵巣腫瘍細胞株 SKOV3 を用いて血管新生関連遺伝子の発現を検討した。遺伝子発現は、SKOV3 を一定時間カルノシン酸で処理した後、全 RNA を回収し、逆転写して cDNA を作成した。この cDNA をもとにし、標的遺伝子特異的プライマーを用いて定量 RT-PCR 法により計測した。定量 RT-PCR は iQ5 (BIO-RAD) を用いて行った。

(4) 有意差の検定は、コントロール群との有意差を Dunnett 法により検定し、p < 0.05 を有意水準とした。

#### 4. 研究成果

(1) カルノシン酸の血管新生への影響をラット血管片をコラーゲンゲル中で 3 次元培養する方法により検討した。図 1(A) に示すように、カルノシン酸は血管片での微小血管成長を有意に抑制した。さらにその効果は濃度依存的であった (図 1(B))。これより、カルノシン酸が血管新生抑制作用を示すことが明らかになった (Kayashima *et al.*、投稿中)。

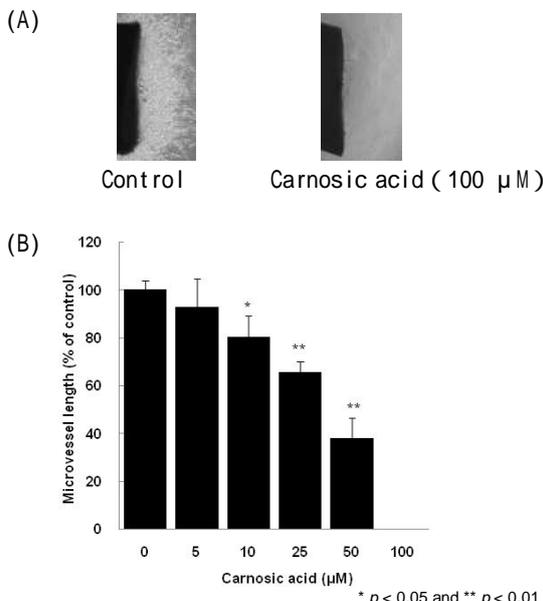


図 1. *ex vivo* ラット動脈片モデルにおける微小血管生成に対するカルノシン酸の影響

(2) カルノシン酸の血管新生抑制効果の作

用機構を明らかにするために、血管内皮細胞を用いて血管新生の主要な過程への影響を検討した。その結果、図 2 に示すように、カルノシン酸は HUVEC における血管様構造形成を有意に抑制した (10 μM)。さらには、細胞増殖 (10 μM) と細胞遊走 (10 μM) も濃度依存的に抑制することが確認された。これより、カルノシン酸は血管内皮細胞の機能抑制を介して血管新生抑制作用を發揮していることが示された。この分子機序を明らかにするために、定量リアルタイム PCR 法により血管新生に関連した因子の発現変動を調べた結果、カルノシン酸処理により血管内皮細胞増殖因子 VEGF の発現が変動する可能性が示された。今後はさらに、血管新生関連因子や Nrf2 関連因子を中心に検討を進める予定である。



Control Carnosic acid (100 μM)  
図 2. HUVEC における血管様構造形成に対するカルノシン酸の影響

(3) カルノシン酸の機能成分としての有効性を個体レベルで評価する手がかりを得るために、血管新生および酸化ストレスが病態の発症・進行に深く関与している癌に対する影響を検討した。ガン細胞として卵巣腫瘍細胞株 SKOV3 を用いて、定量リアルタイム PCR 法により血管新生に関連した因子の発現変動を調べた。その結果、血管内皮細胞の場合と同様にカルノシン酸処理により血管内皮細胞増殖因子 VEGF の発現が変動する可能性が示された。

(4) カルノソールは、カルノシン酸と同じくローズマリーに含まれるポリフェニルテルペノイドであり、カルノシン酸と比べ効果は弱いものの Nrf2 活性化作用が報告されている成分である。そこでカルノソールが血管新生に与える影響について調べた。その結果、図 3 に示したようにカルノソールはコラーゲンゲル中培養のラット動脈片における微小血管の成長を有意に抑制した。しかし、濃度依存的傾向はみられなかった。さらに、血管新生抑制の作用機構について HUVEC を用いた *in vitro* 血管新生モデルで検討したところ、HUVEC の血管管腔形成と細胞増殖に対して抑制効果を示した。カルノソール処理により細胞遊走も抑制されたが、その効果はカルノシン酸と比べて弱かった。これより、カルノソールも血管内皮細胞の機能抑制を介した血管新生抑制作用を示すことが明らか

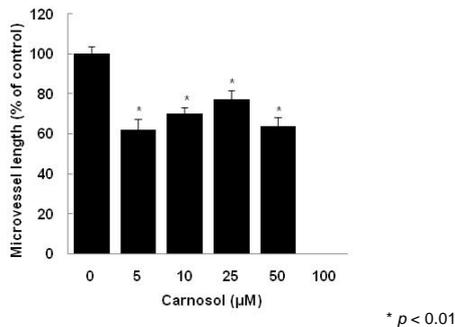


図 3. *ex vivo* ラット動脈片モデルにおける微小血管生成に対するカルノソールの影響

かになった。

以上より、本研究からカルノシン酸が血管新生抑制作用を示すことが明らかとなった。カルノシン酸は酸化ストレスや血管新生が関与するその他の疾病の予防・治療にも有効な機能成分である可能性が示唆された。特に、脳保護作用については、カルノシン酸の血管新生抑制作用も関与する可能性が考えられる。

本研究では、カルノシン酸と同様にローズマリーに含まれるカルノソールについても血管新生抑制作用が確認された。これらの成分を含むローズマリー抽出物が血管新生へ与える影響を検討することも、実生活での応用を考える上で役立つと考えられる。

#### 〔参考文献〕

- 1) Motohashi H., *et al.*, Trends. Mol. Med., 10, 549-557 (2004).
- 2) Satoh T., *et al.*, J. Neurochem., 104, 1116-1131 (2008).
- 3) Anthony H.V., *et al.*, Lancet, 361, 605-608 (2003).

#### 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)

#### 〔学会発表〕(計2件)

萱島知子、松原主典「カルノソールの血管新生抑制作用」日本家政学会、2010年5月20日、広島大学  
Tomoko Kayashima, Mizushina Yoshiyuki, Kiminori Matsubar “The anti-angiogenic and anti-cancer effects of vitamin K<sub>3</sub> and its structurally, related compounds”, 19th International Congress of Nutrition, 9th October 2009, BITEC, Bangkok Thailand

〔その他〕  
 ホームページ等

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

萱島 知子 (Tomoko Kayashima)  
 就実短期大学 生活科学科 講師  
 研究者番号：90452599