

平成 30 年 6 月 25 日現在

機関番号：37404

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K00865

研究課題名(和文)糖・脂質代謝異常症の危険因子に対するポリフェノールの作用機序解明と予防への応用

研究課題名(英文)Studies on the molecular mechanisms of effects of polyphenols on risk factors for glucose and lipid metabolic disorders aiming for the prevention of the metabolic syndrome

研究代表者

徳富 芳子(TOKUTOMI, Yoshiko)

尚綱大学・生活科学部・教授

研究者番号：90253723

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：ポリフェノール類の血管収縮・弛緩に対する影響及び酸化ストレス関連分子への関与を調べた結果、15種類のポリフェノールによるマウス大動脈弛緩作用の機序として、血管内皮での一酸化窒素(NO)産生系の活性化に加え、電位依存性或いはカルシウム活性化カリウムチャネル開口が示された。さらに、アセチルコリンによる大動脈弛緩効果に対する増強がこれらのポリフェノールで認められ、電位依存性或いはカルシウム活性化カリウムチャネルを介した作用であることが示唆された。糖・脂質代謝異常症の予防に有効なポリフェノールの探索とその作用機序の解明に向けて、各種細胞培養系、病態マウス等を用いた検討を進めている。

研究成果の概要(英文)：We examined the direct effects of polyphenols on the contractile response of mouse aortas and whether they are mediated by the endothelium-dependent mechanism. The polyphenols induced dose-dependent relaxation in the aortas precontracted with phenylephrine. The effects were dependent on endothelial nitric oxide (NO) and calcium-activated or voltage-dependent potassium channels as well. Additionally, the polyphenols enhanced acetylcholine-induced relaxation, which was also dependent on the potassium channels. The vasorelaxant effects of the polyphenols observed in this study lend pharmacological support to epidemiological studies, which postulate an inverse association between dietary polyphenol consumption and vascular complications in the related metabolic disorders.

研究分野：生活科学

キーワード：機能性食品成分 ポリフェノール 代謝異常症

## 1. 研究開始当初の背景

野菜や果物などに多く含まれるポリフェノールは、抗酸化、抗炎症、抗アレルギー、抗腫瘍、抗ウイルス作用等の生理活性を持つことが知られている。これまで、ポリフェノールの摂取が様々な生活習慣病のリスク低減につながるという結果は報告されているが、生体内における個々の詳細なメカニズムについて未だ明らかではない。我々は、これまで2型糖尿病モデルマウス、食塩感受性高血圧ラット、アポトーシス関連遺伝子欠損マウス及びNO合成酵素遺伝子欠損マウスなどの病態モデル動物を用い、高脂肪食或いは高食塩摂取と酸化ストレスとの関連について研究を行ってきた。また、冠動脈平滑筋培養細胞を用いたプロテオーム解析によりチオレドキシンと酸化ストレスとの関連性、レドックス(酸化還元)バランス調節に関わる細胞内二次伝達物質8-ニトロcGMPの2型糖尿病モデルマウスの病態における役割について明らかにしてきた。そこで、本研究では、ポリフェノールの抗酸化作用に着目し、糖・脂質代謝異常症モデル動物及び培養細胞を用いて、活性酸素産生、或いは消去系に対するポリフェノールの調節メカニズムを調べ、糖・脂質代謝異常症の危険因子抑制にどのポリフェノールが有効かを明らかにし、新たな予防戦略に応用することを目的とする。

活性酸素による酸化ストレスは、様々な疾患の発症・進展に関与していることが知られており、糖・脂質代謝異常症においても、インスリン抵抗性やアディポカイン産生異常などを惹起し、慢性炎症と酸化ストレスとの悪循環を招いてしまうことが注目されている。近年、糖・脂質代謝異常症の治療薬として次々に新薬も開発されている。しかし予防医学の点で、日々の「食」によるリスク低減がより理想的であることから、食品成分の有効性を解明し、より特異的、効果的な予防法を確立させることは、医療分野をはじめ社会的に極

めて大きな貢献となる。特に、糖・脂質代謝異常症モデル動物を用い、血管組織や、脂肪細胞、マクロファージ、インスリン分泌細胞、肝細胞などでの酸化ストレスに与えるポリフェノールの影響を調べるために、分子生理学的、免疫組織化学的、生化学的技法を駆使した検討は極めて有効であることから、本研究の着想に至った。

## 2. 研究の目的

機能性食品の成分、特にフラボノイド類をはじめとする各種ポリフェノールによる血管機能調節のメカニズムについて明らかにし、さらにメタボリック症候群の危険因子の影響を抑制する効果をもつポリフェノール類を探索し、その成分を糖・脂質代謝異常症の発症予防に応用することを目指した基礎研究である。

## 3. 研究の方法

### (1) 血管収縮・弛緩に対する効果の解析

マウスから大動脈を摘出し、マグヌス法を用いて血管リング標本の等尺性張力に対する各種ポリフェノールの効果を比較し、血管内皮及び平滑筋細胞機能との関連について検討した。

### (2) 3T3-L1 マウス由来 前駆脂肪細胞の分化に対する影響の解析

3T3-L1 細胞から脂肪細胞への分化に及ぼすポリフェノールの影響について検討し、さらに 3T3-L1 細胞内での活性酸素産生系および消去系に対するポリフェノールの影響を調べた。

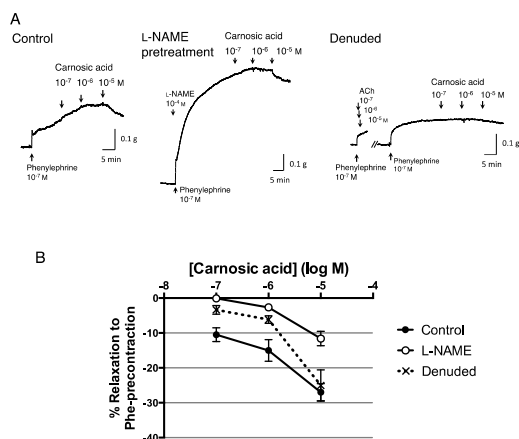
### (3) 個体レベルでのポリフェノールの代謝異常症に対する予防効果の基礎的検討

肥満モデルマウスの血管応答及びキイロショウジョウバエの行動に関するポリフェノールの影響について予備検討を行った。

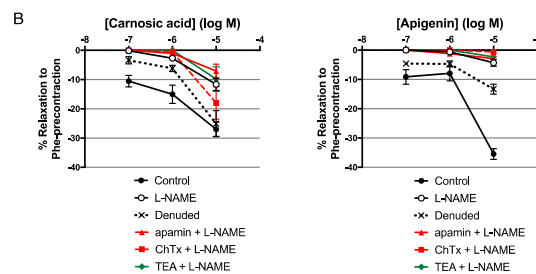
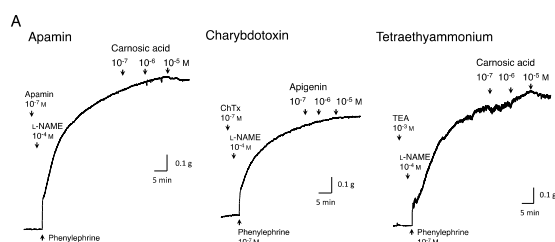
## 4. 研究成果

(1) 酸化ストレス関連分子をはじめとする糖・脂質代謝異常症のリスク因子の制御に有

効な機能性食品成分の探索を行う目的で、各種ポリフェノール(イソラムネチン、ガランギン、グリシテイン、クルクミン、クロロゲン酸、フィセチン、カルノシン酸、ロスマリン酸、p-クマル酸、エンテロジオール、プロトカテキ酸、バルバロイン、ナリルチン、アルテピリンC、ヘスペレチン)の血管収縮・弛緩に対する影響および酸化ストレス関連分子への関与を調べた。マウス大動脈リング標本の収縮張力に対する上記ポリフェノールの影響を調べた結果、一酸化窒素(NO)依存性の弛緩作用が観察され、その弛緩作用には濃度依存性が認められた。血管内皮除去標本やNO合成酵素阻害剤、各種K<sup>+</sup>チャネル遮断薬を用いて調べた結果、血管内皮細胞でのNO合成系活性化のほかに、内皮細胞或いは平滑筋細胞の電位依存性或いはCa<sup>2+</sup>活性化K<sup>+</sup>チャネルが開くことで弛緩応答が現われることが示された。

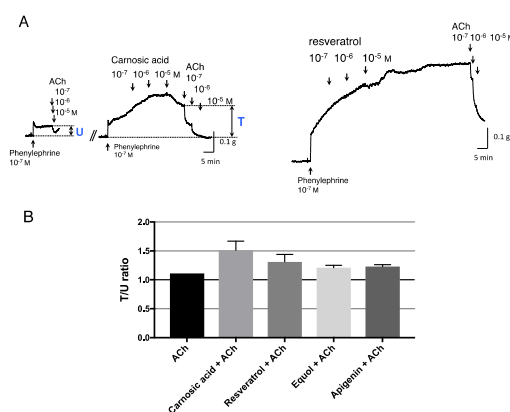


**Fig. 1.** Effects of L-NAME and denudation on carnosic acid-induced relaxation to phenylephrine-precontraction. Representative traces (A) and summarized data (B) of vascular responses to cumulatively administered carnosic acid in the phenylephrine-precontracted aorta.

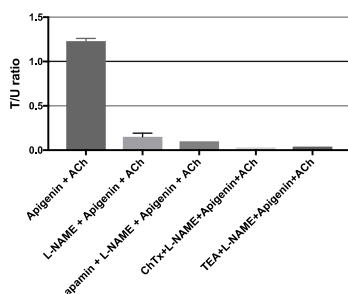


**Fig. 2.** Effects of K<sup>+</sup> channel blockers on the polyphenol-induced relaxation to phenylephrine-precontraction. Representative traces (A) and summarized data (B) of vascular responses to cumulatively administered carnosic acid or apigenin in the phenylephrine-precontracted aorta. Arrows in each trace indicate administration of phenylephrine, carnosic acid, apigenin, apamin, charybdotoxin (ChTx), tetraethylammonium (TEA) or L-NAME.

さらに、ポリフェノール存在下でアセチルコリン弛緩反応の増強が観察され、この増強には、血管内皮細胞由来のNOが関与し、加えて電位依存性或いはCa<sup>2+</sup>活性化K<sup>+</sup>チャネル開口も関与していることが示された。以上より、今回用いた15種類のポリフェノールには、血管内皮細胞でのNO合成系活性化のほかに、K<sup>+</sup>チャネル開口作用があることから、これらの作用による弛緩が血管収縮を起こしにくくする機序の一因であると考えられ、血管内皮細胞の障害を補う効果を有する可能性が示唆された。



**Fig. 3.** Effects of polyphenols on acetylcholine (ACh)-induced relaxation to phenylephrine-precontraction. Representative traces (A) and summarized data (B) of vascular responses to ACh in the presence of polyphenols.



**Fig. 4.** Effects of L-NAME or K<sup>+</sup> channel blockers on apigenin-induced enhancement of acetylcholine (ACh) relaxation to phenylephrine-precontraction. Summarized data of vascular responses to ACh in the presence of apigenin.

(2) 3T3-L1 マウス由来 線維芽細胞から脂肪細胞への分化に及ぼすポリフェノールの影響について調べた結果、分化促進と抑制の効果の程度はポリフェノールによって異なることが示唆され、さらに詳細な検討が必要であることが分かった。

(3) ポリフェノール類が、糖・脂質代謝異常症に伴う血管内皮機能障害を起こりにくくするために有用であるかどうか、病態マウスや各種細胞培養系を用いて詳細な検討を進めている。また、糖・脂質代謝に及ぼすポリフェノールの影響についてキロシヨウジョウバエを用いた行動解析から評価できるか、予備検討を行っている。

## 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 1 件 )

(1) Roles of calcium-activated and voltage-dependent potassium channels in polyphenol-induced vasorelaxation of isolated mouse aortic rings. Tokutomi Y, et al. Journal of Pharmacological Sciences 133(Suppl):S205, 2017. ( 査読無 )

[ 学会発表 ] ( 計 2 件 )

(1) ポリフェノールの血管弛緩応答における Ca<sup>2+</sup>活性化 K<sup>+</sup>チャネル及び電位依存性 K<sup>+</sup>チャネルの役割、徳富芳子 et al.、第 90 回日本薬理学会年会、平成 29 年 3 月 15-17 日、長崎ブリックホール ( 長崎市 )

(2) キロシヨウジョウバエの行動解析と薬理学的応用、徳富芳子 et al.、第 34 回日本

薬学会九州支部大会、平成 29 年 11 月 25-26 日、崇城大学 ( 熊本市 )

[ 図書 ] ( 計 0 件 )

[ 産業財産権 ]  
出願状況 ( 計 0 件 )  
取得状況 ( 計 0 件 )

[ その他 ]  
なし

## 6 . 研究組織

(1) 研究代表者

徳富 芳子 ( TOKUTOMI Yoshiko )

尚綱大学・生活科学部・教授

研究者番号 : 9 0 2 5 3 7 2 3

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者

(4) 研究協力者