

令和元年6月24日現在

機関番号：10106

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K00843

研究課題名(和文)ハマナス花弁ポリフェノールによるアテローム性動脈硬化症予防作用

研究課題名(英文)Preventive effect of polyphenols in rugosa rose petals on arteriosclerosis

研究代表者

新井 博文(Hirofumi, Arai)

北見工業大学・工学部・教授

研究者番号：70295848

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)：アテローム性動脈硬化症の発症機序として、動脈内皮細胞下で活性酸素種(ROS)および活性窒素種(RNS)酸化された低密度タンパク質(LDL)がマクロファージに貪食されることが示唆されている。本研究では、ハマナス花弁ポリフェノールの生理作用の一つとして、アテローム性動脈硬化症の予防効果を明らかにすることを目的とした。主要なハマナス花弁ポリフェノールであるテリマグランジンIは、ROSおよびRNSによるLDLの脂質過酸化およびタンパク質酸化修飾を強く抑制することが示された。ハマナス花弁ポリフェノールは生体酸化ストレスを抑制することで、アテローム性動脈硬化症を予防する可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ハマナス花弁の主要ポリフェノールであるテリマグランジンIは、食品や生薬中に存在することが知られているが、その生理機能に関しては報告が少なかった。本研究では、ハマナス花弁ポリフェノールの新たな生理機能の一つとして抗酸化作用を介したアテローム性動脈硬化症の予防効果の解明を目指した。その成果として、ハマナス花弁ポリフェノールがアテローム性動脈硬化症の発症原因となる低密度リポタンパク質の酸化を強く抑制することが明らかになったことにより、その抗酸化作用を活かした機能性食品の開発に貢献できると考えられる。

研究成果の概要(英文)：It has been suggested that low-density lipoprotein (LDL) oxidation by reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen species (RNS), followed by scavenging by monocyte-derived macrophages under the arterial endothelium, leads to atherosclerosis. Objectives of this study are to investigate anti-atherogenic effects of polyphenols of rugosa rose petals, as a physiological function of them. Tellimagrandin I, a major polyphenol of rugosa rose petals, strongly suppressed lipid peroxidation and oxidative modification of protein in LDL oxidized by ROS and RNS. These results suggest that polyphenols of rugosa rose petals may prevent arteriosclerosis by reducing oxidative stress.

研究分野：食品学

キーワード：ハマナス ポリフェノール テリマグランジンI 活性酸素 酸化ストレス 低密度リポタンパク質 アテローム性動脈硬化症

1. 研究開始当初の背景

(1) アテローム性動脈硬化症の発症機序

日本人の死因の約2割は、アテローム性動脈硬化症に起因する脳血管疾患および心血管疾患であり、その予防は国民の健康を維持する上で重要な課題である。アテローム性動脈硬化症の危険因子として、高LDLコレステロール血症、高血圧、糖尿病、喫煙等が挙げられる。高LDLコレステロール血症では、血中で脂質運搬を担うリポタンパク質の一種である低密度リポタンパク質(LDL)が食生活習慣等によって増加する。血管内皮下で増加したLDLは、血管内皮の微小損傷や喫煙等で生成する活性酸素種(ROS)や活性窒素種(RNS)によって酸化される。単球から分化したマクロファージは、血管内皮下で酸化LDLを貪食して泡沫細胞へと変化し、アテローム性プラークを形成する。アテローム性プラークは長期間をかけて炎症を伴いながら成長し、血流を妨げ、さらに遮断に至る。LDLは粒子状構造をとり、外殻はLDL受容体のリガンドとして機能するアポリポタンパク質(apo)B-100、リン脂質およびコレステロールで構成され、内部には疎水性のコレステロールエステルおよびトリグリセリドが存在する。LDLがROSの攻撃を受けると、初めにこれらの脂質が酸化され、生成した過酸化脂質によってさらにタンパク質(apoB-100)が酸化修飾されて変性する。

(2) アテローム性動脈硬化症の治療と食品成分による予防

アテローム性動脈硬化症の予防・改善策として、食事制限による高LDLコレステロール血症、高血圧、糖尿病、肥満の改善や禁煙などが行われている。近年、LDLコレステロール低下作用やLDL酸化抑制作用を示す食品成分の研究が注目されており、薬剤の服用に比べて副作用が少ないことからその有用性が期待されている。これまでに国内外の研究によって、カテキン、フラボノール、イソフラボン等のポリフェノールによるアテローム性動脈硬化症予防作用が報告されている。これらの化合物の生理活性には分子構造が関連していると考えられるが、その作用機序は明らかではない。ハマナス(*Rosa rugosa*)は、主に北海道の海岸に広く自生するバラ科植物であり、現在主にハーブティー等の原料として用いられている。アイヌ民族は古来よりハマナスを伝統的薬草として利用しており、何らかの薬理作用を示すと考えられるが、その有効性は科学的に証明されていない。ハマナス花弁中のポリフェノールとしては、テリマグランジンⅠが最も多く含まれることが報告されている。テリマグランジンⅠは、分子内にガロイル基およびヘキサヒドロジフェノイル基を有しており、強い抗酸化作用を示すと予想されるが、その活性は明らかではない。

2. 研究の目的

本研究では、ハマナス花弁ポリフェノールの生理機能の一つとして、アテローム性動脈硬化症の予防作用を*in vitro*実験(LDL酸化抑制およびマクロファージ貪食抑制)および*in vivo*実験(病態マウスの酸化ストレス抑制)で明らかにすることを目的とした。

(1) ハマナス花弁から実験に必要な量の主要ポリフェノールを単離する。

(2) ROSおよびRNSによってヒトLDLの酸化を誘導し、ハマナス花弁ポリフェノールの酸化抑制作用を脂質過酸化およびapoB-100酸化修飾を指標として調べる。その有効性は、既知の抗酸化性化合物との活性比較で評価する。

(3) マクロファージによる酸化LDLの貪食測定法を確立し、これを用いてハマナス花弁ポリフェノールの貪食抑制作用を評価する。

(4) 高LDL血症を誘導したアポE欠損マウスを用いて、ハマナス花弁抽出物の摂食による酸化ストレス抑制作用を調べる。

3. 研究の方法

(1) ハマナス花弁抽出物調製およびポリフェノール単離

乾燥ハマナス花弁から、水/エタノール溶媒によって抽出を行い、分取カラムクロマトグラフィーおよび高速液体クロマトグラフィー(HPLC)等によってポリフェノールを単離した。

(2) ハマナス花弁ポリフェノールによる LDL 酸化抑制作用

LDL の脂質過酸化に対する抑制作用

ヒト血清から超遠心分離によって LDL 画分を分取し、これを限外ろ過および透析によって精製した。ハマナス花弁ポリフェノールの存在下で LDL を ROS(ペルオキシラジカル発生試薬: AAPH および遷移金属イオン: Cu^{2+}) および RNS(ペルオキシナイトライト発生試薬: SIN-1) とともに 37 °C でインキュベートし、酸化を誘導した。過酸化脂質(コレステロールエステルヒドロペルオキシド: CE-OOH)を HPLC/UV で、過酸化脂質分解物(チオバルビツール酸反応性物質: TBARS)を HPLC/蛍光で測定した。

LDL のタンパク質酸化に対する抑制作用

LDL の酸化で生成する過酸化脂質は、LDL 粒子表面に存在するタンパク質である apoB-100 を酸化修飾し、その断片化およびカルボニル化を誘導する。SDS-PAGE / ウエスタンブロット(抗 apoB-100 および抗ジニトロフェニル抗体)により、酸化 LDL 中のタンパク質を分析した。

(3) ハマナス花弁ポリフェノールによるマクロファージの酸化 LDL 貪食抑制作用

ヒト単球由来細胞株(THP-1)を phorbol 12-myristate 13-acetate 処理することによってマクロファージへ分化させた。THP-1 を酸化 LDL とともにインキュベートした後、蛍光プローブを加えて細胞内に取り込まれた過酸化脂質と反応させた。細胞の蛍光強度を蛍光顕微鏡で撮影し、画像処理によって酸化 LDL の貪食量を定量化した。

(4) 高 LDL 血症マウスの酸化ストレス抑制作用

アポ E 欠損マウスにハマナス花弁ポリフェノール抽出物を 0.1%含む AIN-93G 飼料を 4 週間自由摂取させて体重および飼料摂取量を測定した。ペントバルビタール麻酔下で解剖し、血液および臓器を採取した。血清中の総脂質、トリグリセリド、LDL、HDL およびコレステロールを測定するとともに、TBARS 濃度を測定した。

4. 研究成果

(1) ハマナス花弁ポリフェノールによる LDL 酸化抑制作用およびマクロファージの酸化 LDL 貪食抑制作用 (*in vitro* 実験)

ハマナス花弁の主要ポリフェノールであるテリマグランジン I は、AAPH による過酸化脂質(CE-OOH)の生成を濃度依存的かつ有意に抑制した(図 1)。その活性は、ビタミン E 誘導体である Trolox よりも顕著に高かった。また、テリマグランジン I は、 Cu^{2+} および SIN-1 による脂質過酸化反応(TBARS および CE-OOH の生成)についても濃度依存的かつ有意に抑制し、その活性は Trolox よりも顕著に高かった。さらにテリマグランジン I は、AAPH(図 2)、 Cu^{2+} および SIN-1 による apo B-100 の酸化修飾を抑制した。また、テリマグランジン I は、マクロファージによる酸化 LDL の貪食量を低下させる傾向が認められた。

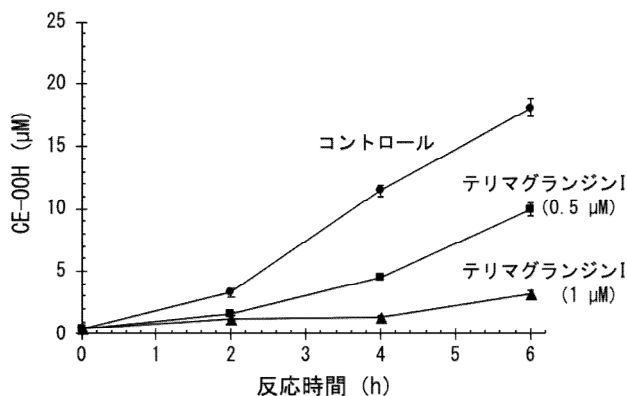


図1 AAPHによるLDLの脂質過酸化に対するテリマグランジンIの効果

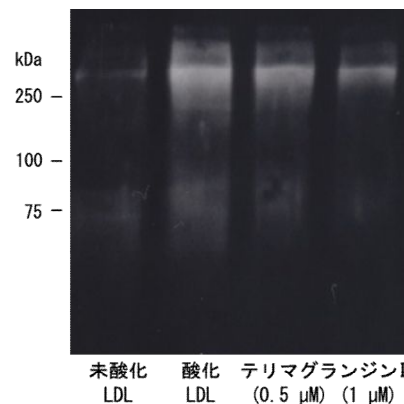


図2 AAPHによるLDLのapo B-100酸化修飾に対するテリマグランジンIの効果

(2) 高 LDL 血症マウスの酸化ストレス抑制作用 (*in vivo* 実験)

対照群およびハマナス花弁抽出物投与群の摂餌量、体重変化、臓器重量、血清脂質成分に有意な差は認められなかった。一方、ハマナス花弁抽出物投与群の血清 TBARS 濃度は、対照群に比べて低くなる傾向が認められた。

(3) 結論

in vitro 実験の結果から、テリマグランジン I は、アテローム性動脈硬化症の原因となる ROS および RNS による LDL の脂質過酸化およびタンパク質酸化修飾の抑制することが示された。また、アテローム性動脈硬化症における血管内膜の肥厚に関するマクロファージによる酸化 LDL の貪食に対して、テリマグランジン I は抑制的に働く可能性が示唆された。さらに、*in vivo* 実験の結果から、ハマナス花弁ポリフェノールは生体酸化ストレスを抑制することで、アテローム性動脈硬化症を予防する可能性が示唆された。

< 引用文献 >

Arai, H., *Subcell Biochem.*, **77**, 103-114 (2014).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 2 件)

Arai, H., Sekimoto, S., Sukhbold, E., Hosomi, R., Fukunaga, K., Yamagishi, T., and Takasugi, M.

Suppression of Low-Density Lipoprotein Oxidation by Tellimagrandin I.

International Conference on Oxidative Stress Reduction, Redox Homeostasis and Antioxidants, Jun. 2018, Paris (France).

Arai, H., Sekimoto, S., Mizuma, T., Saitoh, H., Sukhbold, E., Takasugi, M.
Effects of tellimagrandin I on Oxidation of Low-Density Lipoprotein.

International Conference on Polyphenols and Health, Oct. 2017, Quebec City (Canada).

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年:

国内外の別:

取得状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：福永 健治

ローマ字氏名：(FUKUNAGA, kenji)

所属研究機関名：関西大学

部局名：化学生命工学部

職名：教授

研究者番号 (8 桁) : 30278634

(2)研究協力者

研究協力者氏名：山岸 喬

ローマ字氏名：(YAMAGISHI, takashi)

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。