

令和 2 年 6 月 26 日現在

機関番号：11101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K00844

研究課題名(和文)カシスが秘めるフィトエストロゲン作用 -血管内皮と皮膚に対する保健効果の探索-

研究課題名(英文)Effects of blackcurrant phytoestrogens on vascular endothelium and skin

研究代表者

七島 直樹 (Naoki, Nanashima)

弘前大学・保健学研究科・准教授

研究者番号：80333730

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では血管内皮と皮膚に対してカシスが秘めるフィトエストロゲンの保健効果を見出すことを目的としている。

研究の結果、ヒト皮膚線維芽細胞ではカシスアントシアニンの投与で美容関連遺伝子の発現亢進が認められ、血管内皮細胞においても、血管拡張因子に関連する酵素の発現が亢進した。更年期モデルラットにおいてもカシスは皮膚の美容と血管内皮機能の改善効果に寄与していることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究によって血管内皮機能そして皮膚美容効果に対するカシスのフィトエストロゲン効果が明らかになれば、カシス由来フィトエストロゲンの機能性食品への開発に繋げることができる。また、カシスに付加価値が付くことで、カシス産業やカシスの生産量が最大である青森県の地域産業への発展が期待される。また、本研究はニュージーランド・オタゴ大学との連携のもとに行われており、本研究を足がかりに、オタゴ大学との連携をさらに発展させ、将来的には研究者交流や大学院生の交換留学などへの発展も視野に入れているために、教育への波及効果も期待される。以上のことから、本研究の意義は大きく、その社会的貢献およびインパクトは大きい。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to determine the health effects of blackcurrant phytoestrogens on the vascular endothelium and skin. The results showed that the expression of beauty-related genes, such as COL1A1, COL3A1, and hyaluronan synthase 3, was increased in human dermal fibroblasts after the administration of blackcurrant anthocyanin and blackcurrant extract (BCE). Moreover, the expression of enzymes related to vasodilation was increased in vascular endothelial cells. The amounts of collagen, hyaluronic acid, and elastin were increased in the skin of menopausal model rats fed with a diet containing 3% BCE. Furthermore, the expression of eNOS was increased in blood vessels. These results suggested that the phytoestrogens of the BCE affected the skin and improved the function of the vascular endothelium.

研究分野：分子生物学

キーワード：カシス フィトエストロゲン 更年期症状

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

カシス (*Ribes nigrum*) は、小さな食用の果実をつける落葉低木であり、ニュージーランドやポーランドなどの冷涼な地域での生産量が豊富である。日本では青森県での生産量が最大である。

アントシアニンとは花卉の色などを構成するフラボノイド系の植物色素である。近年では食品の生理機能の立場から、アントシアニンにおける生体調節機能や視覚改善、メタボリック症候群の予防、抗腫瘍効果など種々の疾病予防に対しての有効性が明らかにされつつある。カシスにおけるアントシアニンはデルフィニジン-3-グルコシド(D3G)、デルフィニジン-3-ルチノシド(D3R)、シアニジン-3-グルコシド(C3G)、シアニジン-3-ルチノシド(C3R)の4種類存在し、特にD3RとC3Rはカシス特有の成分で、アントシアニンが豊富とされるブルーベリーやビルベリーなどには含まれていない。

植物には女性ホルモンであるエストロゲンに構造が似た分子、すなわち、フィトエストロゲンが存在することが知られており、一般的に大豆イソフラボンの一種であるゲニステインなどが有名である。皮膚の加齢現象や血管内皮機能の低下による動脈硬化の亢進の背景には更年期や喫煙によるエストロゲンの減少が大きく関わっているため、日常のフィトエストロゲンの摂取は皮膚や血管に対する保健効果があると考えられている。アントシアニンにフィトエストロゲン作用があることは Schmitt らが提唱しているのみであり (*Nutrition and Cancer*, 2001)、カシス由来アントシアニンのフィトエストロゲン効果についての報告例はこれまで皆無であった。

申請者は近年、カシスアントシアニンにはエストロゲン受容体を介したフィトエストロゲン活性があることを見出した。さらに、ヒトにおいてカシスアントシアニンを摂取した喫煙者では末梢の血管が拡張し、血流が改善する可能性のあることを見出した。近年明らかにしたこれらの結果より、申請者は、カシスアントシアニンの血管内皮や皮膚へのフィトエストロゲン効果を解明するという着想に至った。

## 2. 研究の目的

前述の着想点にもとづき、下記の2点を研究期間内に明らかにし、カシスアントシアニンが秘める血管内皮機能と皮膚に対するフィトエストロゲンの保健効果を明らかにすることを目的としている。

- (1) ヒト皮膚線維芽細胞ならびに血管内皮細胞に与える影響を分子生物学的に解明する。
- (2) 卵巣除去ラットに及ぼす皮膚と血管への効果を分子生物学・病理学的に解明する。

## 3. 研究の方法

【カシスアントシアニンのヒト皮膚線維芽細胞 (HSF) におけるフィトエストロゲン効果】

- (1) アントシアニンとエストロゲン受容体との相互作用を *in silico* 解析により可視化した。
- (2) HSF にカシス抽出物 (BCE) および各アントシアニンを投与し、エストロゲンのシグナリングが活性化するかをマイクロアレイおよびシグナル解析システム IPA にて網羅的に解析し、さらに美容関連遺伝子の発現変動をリアルタイム PCR で調べた。

【カシスアントシアニンの血管内皮細胞へのフィトエストロゲン効果】

上記と同様の濃度のカシスアントシアニンをヒト血管内皮細胞に投与し、血管拡張物質で抗動脈硬化因子である一酸化窒素 (NO) 産生量の変化、エストロゲン受容体の下流遺伝子の変動や、細胞シグナル伝達の変化など解析した。

【卵巣除去ラットにおけるカシスアントシアニンのフィトエストロゲン効果】

- (1) 卵巣摘出した12週齢の雌ラットに3%BCEを含んだ餌を3ヶ月投与した。陰性コントロールにはBCEが含有されていない普通餌を与え、偽手術により卵巣が除去されていないラットに普通餌を投与した群を陽性コントロールとした。卵巣を除去したラットからはエストロゲンが分泌されず、フィトエストロゲン活性の評価をするモデルとして一般的に用いられている。
- (2) 皮膚のHE染色、コラーゲン、ヒアルロン酸を染色し、病理学的な変化を評価した。
- (3) 血管内皮機能バイオマーカーとして内皮型NO合成酵素 (eNOS) の発現を免疫染色法で評価した。

## 4. 研究成果

【カシスアントシアニンのERを介したフィトエストロゲン効果】

ER-estradiol複合体にcyanidin及びdelphinidinをドッキングしたドッキングモデルでは、cyanidin及びdelphinidinは周辺のERのアミノ酸残基と原子の衝突を起こさず、ポケット内部の空間内に収まった。ER-estradiol複合体において、estradiolはERのGlu305、Arg346、His475と水素結合を形成していた。

ドッキングモデルからは、estradiolと同様に、cyanidin及びdelphinidinのphenyl基の4位のヒドロキシル基がERのGlu305及びArg346と、benzopyrylium基の5位のヒドロキシル基がERのHis475と水素結合を形成することが推察された。このことから、cyanidin及びdelphinidinはERの結合ポケット内部にestradiolと同様の配置で結合可能であると予測された。

cyanidin 及び delphinidin のドッキングに基づき、cyanidin-3-glucoside, cyanidine-3-rutinoside, delphinidin-3-glucoside 及び delphinidin-3-rutinoside を配置し、グルコシドまたはルチノシドで回転可能な結合のロータマーを回転させることによって3位のグルコース、ルチノースが収まる空間を探索した。探索では、グルコース及びルチノースのいずれかの原子が周辺の helix3 及び helix12 に存在するアミノ酸残基と衝突を起こし、糖鎖が立体障害無く空間に収まる配置は検出されなかった。

我々はこれまでにカシスアントシアニンが ER を介したフィトエストロゲン効果を有していることを見出しているが、本研究によって、ER にも同様の効果がある可能性を見出した。

#### 【カシスの HSF におけるフィトエストロゲン効果】

BCE ならびにカシスアントシアニンは HSF において、COL1A1(I 型コラーゲン), COL3A1 (III 型コラーゲン), Elastin (エラスチン), HAS3 (ヒアルロン酸合成酵素) などの細胞外マトリックス成分の合成に関する遺伝子と細胞外マトリックス成分分解酵素を抑制する TIMP3 などの遺伝子の発現を亢進させた。

#### 【更年期モデルラットによる皮膚美容効果と更年期性脱毛の軽減効果】

更年期モデルラットにおける皮膚真皮のコラーゲン、エラスチン、ヒアルロン酸はカシス抽出物を投与したラットの方が増加した。また、同ラットの毛包当たりの毛の本数を計測するとカシス抽出物を摂取したラットの更年期性脱毛が 1.5 倍程度軽減した。

ヒト毛乳頭細胞に 1 µg/ml BCE を投与して 24 時間培養した後、RNA を抽出しマイクロアレイおよびリアルタイム PCR 解析を行った。その結果、beta-estradiol の下流遺伝子が多数変動しており、毛包の幹細胞マーカーである keratin (Krt)19 の発現が大幅に亢進していた。更年期女性のモデルラットに 3% BCE 含有餌を 3 か月間摂取させた。HE 染色により毛の数を計測した結果、カシスを摂取した方が毛包当たり平均 0.5 本の毛が増加し、免疫染色によって細胞増殖マーカーの ki67 の発現も亢進していることが明らかになった。さらに幹細胞マーカーの Krt19、Krt15 ならびに CD34 を蛍光免疫染色で評価した結果、毛包細胞における発現の亢進が認められた。BCE には毛包に対してフィトエストロゲン効果を発揮し、毛包の stemness を改善することで、更年期モデルラットの薄毛改善に寄与することが明らかになった。

マイクロアレイ及び IPA による網羅的解析により、BCE は HSF において、エストロゲンの下流遺伝子を大幅に変動させたことからカシスアントシアニンはフィトエストロゲンとして作用し、更年期における皮膚保健機能に寄与していることが示唆された (表 1)。

表 1 BCE 投与によって誘導された beta-estradiol の下流遺伝子

Gene symbol	Gene name	Exp Fold Change
IGFBP2	insulin-like growth factor binding protein 2, 36kDa	115.308
IGF2	insulin-like growth factor 2	26.576
WNT11	wingless-type MMTV integration site family, member 11	16.906
TTR	transthyretin	14.21
EGR2	early growth response 2	12.325
WNT5A	wingless-type MMTV integration site family, member 5A	8.406
PLXDC1	plexin domain containing 1	7.708
CRABP2	cellular retinoic acid binding protein 2	7.566
LTBP1	latent transforming growth factor beta binding protein 1	7.541
SFRP1	secreted frizzled-related protein 1	6.232

#### 【カシスアントシアニンの血管内皮細胞へのフィトエストロゲン効果】

ヒト臍帯静脈内皮細胞に BCE を投与し、遺伝子発現をマイクロアレイで解析するとエストロゲン受容体の下流遺伝子が大きく活性化していた。また、卵巣除去ラットの血管では 3%BCE を摂取したラットにおいてエラスチンが増加した。さらに、eNOS の発現が増加していた。これらの結果から、BCE は皮膚や血管内皮においてフィトエストロゲン効果を発揮し、血管内皮機能の改善効果を有していることが示唆された。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Tomisawa Toshiko, Nanashima Naoki, Kitajima Maiko, KasumiMaiko, Mikami Kasumi, Takamagi Shizuka, Maeda Hayato, Horie Kayo, Lai Fu-chih, Osanai Tomohiro	4. 巻 24
2. 論文標題 Effects of Blackcurrant Anthocyanin on Endothelial Function and Peripheral Temperature in Young Smokers	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Molecules	6. 最初と最後の頁 4295 ~ 4259
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/molecules24234295	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Nanashima Naoki, Horie Kayo	4. 巻 24
2. 論文標題 Blackcurrant Extract with Phytoestrogen Activity Alleviates Hair Loss in Ovariectomized Rats	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Molecules	6. 最初と最後の頁 1272 ~ 1272
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/molecules24071272	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Horie Kayo, Nanashima Naoki, Maeda Hayato	4. 巻 24
2. 論文標題 Phytoestrogenic Effects of Blackcurrant Anthocyanins Increased Endothelial Nitric Oxide Synthase (eNOS) Expression in Human Endothelial Cells and Ovariectomized Rats	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Molecules	6. 最初と最後の頁 1259 ~ 1259
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/molecules24071259	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Nanashima Naoki, Horie Kayo, Maeda Hayato, Tomisawa Toshiko, Kitajima Maiko, Nakamura Toshiya	4. 巻 10
2. 論文標題 Blackcurrant Anthocyanins Increase the Levels of Collagen, Elastin, and Hyaluronic Acid in Human Skin Fibroblasts and Ovariectomized Rats	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Nutrients	6. 最初と最後の頁 495 ~ 495
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/nu10040495	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Nanashima Naoki, Horie Kayo, Maeda Hayato	4. 巻 23
2. 論文標題 Phytoestrogenic Activity of Blackcurrant Anthocyanins Is Partially Mediated through Estrogen Receptor Beta	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Molecules	6. 最初と最後の頁 74 ~ 74
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/molecules23010074	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Nanashima Naoki, Horie Kayo, Chiba Mitsuru, Nakano Manabu, Maeda Hayato, Nakamura Toshiya	4. 巻 16
2. 論文標題 Anthocyanin-rich blackcurrant extract inhibits proliferation of the MCF10A healthy human breast epithelial cell line through induction of G0/G1 arrest and apoptosis	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Molecular Medicine Reports	6. 最初と最後の頁 6134 ~ 6141
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/mmr.2017.7391	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nanashima Naoki, Yamada Toshiyuki, Shimizu Takeshi, Tsuchida Shigeki.	4. 巻 22
2. 論文標題 Involvement of Clustered Genes in Mammalian Functions: Their Relation in a Rat Mutant Strain.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Journal of molecular evolution	6. 最初と最後の頁 1-3
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00239-017-9788-6.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nanashima Naoki, Horie Kayo, Yamada Toshiyuki, Shimizu Takeshi, Tsuchida Shigeki.	4. 巻 37
2. 論文標題 Hair keratin KRT81 is expressed in normal and breast cancer cells and contributes to their invasiveness.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Oncology reports	6. 最初と最後の頁 2964-2970
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/or.2017.5564.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 七島直樹
2. 発表標題 カシスが秘めるフィトエストロゲン効果
3. 学会等名 第19回青森糖質研究会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 堀江香代, 七島直樹
2. 発表標題 カシス抽出物は更年期障害の軽減に有効か?
3. 学会等名 イノベーションジャパン2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 西山広亮, 七島直樹, 堀江香代, 前多隼人
2. 発表標題 血管内皮細胞に対するカシスアントシアニンのフィトエストロゲン作用
3. 学会等名 第58回日本油化学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Minori Shimada, Hayato Maeda, Naoki Nanashima, Kiyofumi Yamada, Akira Nakajima
2. 発表標題 The effect of anthocyanin-rich blackcurrant extracts on behavioral abnormalities in SAMP8 mice.
3. 学会等名 第92回日本薬理学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 七島直樹, 堀江香代, 前多隼人
2. 発表標題 エストロゲン受容体 を介したカシスアントシアニンのフィトエストロゲン作用
3. 学会等名 第91回日本生化学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 七島直樹, 堀江香代, 富澤登志子, 北島麻衣子, 前多隼人
2. 発表標題 カシスアントシアニンが秘めるフィトエストロゲン活性の探索
3. 学会等名 日本分子生物学会/日本生化学会 2017年度生命科学系学会合同年次大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 七島直樹, 堀江香代, 富澤登志子, 北島麻衣子, 藤田俊文, 前多隼人, 加藤陽治
2. 発表標題 エストロゲン受容体 を介したカシスアントシアニンのフィトエストロゲン活性
3. 学会等名 第71回日本栄養・食糧学会大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 七島直樹, 堀江香代, 山田俊幸, 清水武史, 土田成紀
2. 発表標題 乳がん細胞におけるHair keratin 81の発現と浸潤への関与
3. 学会等名 第75回 日本癌学会学術総会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 藤田俊文, 富澤登志子, 北島麻衣子, 高間木静香, 七島直樹, 前多隼人, 加藤陽治, 岩田学
2. 発表標題 カシスアントシアニン摂取が運動後の酸化ストレスに及ぼす影響
3. 学会等名 第51回日本理学療法学会
4. 発表年 2016年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 更年期症状改善用組成物	発明者 堀江香代, 七島直樹	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2019-93226	出願年 2019年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	堀江 香代 (Horie Kayo) (30626825)	弘前大学・保健学研究科・助教  (11101)	
研究分担者	富澤 登志子 (Tomisawa Toshiko) (70333705)	弘前大学・保健学研究科・教授  (11101)	
研究分担者	北島 麻衣子 (Kitajima Maiko) (70455731)	弘前大学・保健学研究科・助教  (11101)	