

平成 21 年 5 月 22 日現在

研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2006～2008
 課題番号：18700608
 研究課題名 (和文) 血管新生抑制作用を有する抗酸化成分によるメタボリックシンドローム発症予防の検討
 研究課題名 (英文) Preventive effect of antioxidant compounds with antiangiogenic activity on metabolic syndrome
 研究代表者
 松原 主典 (MATSUBARA KIMINORI)
 広島大学・大学院教育学研究科・准教授
 研究者番号：90254565

研究成果の概要：本研究では、抗酸化作用を有する食品成分であるカロテノイド・ポリフェノール類から血管新生抑制作用を示すものを新たに見出し、その作用機序について血管内皮細胞を用いて明らかにした。更に、それらの成分が、血管内皮細胞に対して保護的に作用することや肥満に繋がる幹細胞からの脂肪細胞分化を抑制することを見出した。これらの成果から、抗酸化作用と血管新生抑制作用を有する食品成分は、メタボリックシンドローム発症予防に有効であることが示唆された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	1,200,000	0	1,200,000
2007年度	1,100,000	0	1,100,000
2008年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	330,000	3,730,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：生活科学・食生活学

キーワード：抗酸化成分、血管新生、メタボリックシンドローム、ビタミン、血管内皮細胞、脂肪細胞、幹細胞

1. 研究開始当初の背景

近年の生活習慣は、運動量が少ないにもかかわらず食事からのエネルギー摂取が多い傾向があり、余剰のエネルギーが脂肪として体内に蓄積され肥満に繋がっている。また、肥満は高血圧や糖尿病などの生活習慣病の主な要因である。更に深刻なのは、これらの生活習慣病を併発し、心筋梗塞や脳梗塞等の重篤な疾病のリスクが高まるメタボリックシンドロームに移行することである。メタボリックシンドロームは社会的に重要な労働者

層に増加していることから、その予防は重要である。メタボリックシンドロームの予防には運動と食事の両面からの見直しが必要であるが、実生活において運動時間の確保は難しいことが多い。一方、食事は日常生活に欠かすことができないことから、その改善や特定の生体機能調節作用を有する食品の利用は容易に行える。したがって、メタボリックシンドローム発症予防に有用な食品成分を見出し、その有用性を検討することは社会的に意義深い。

2. 研究の目的

メタボリックシンドロームは種々の要因が重なり合って発症する。その主要な要因は、肥満によって増加した脂肪細胞から分泌される腫瘍壊死因子 (TNF- α) やプラスミノゲン活性化因子阻害物質 (PAI-1) などがある。また、これらの因子や糖尿病による高血糖がもたらす酸化ストレスが血管系細胞を障害することがメタボリックシンドロームを誘発することも明らかとなっている。従って、肥満の予防と酸化ストレスからの血管機能保護がメタボリックシンドローム発症予防に有効であると考えられる。また、近年血管新生抑制物質により肥満の予防が可能であることが示されている。従って、抗酸化作用を有する食品機能成分が血管新生抑制効果も示せば、肥満予防と酸化ストレスによる血管障害の予防になり、メタボリックシンドローム発症予防に有用となる可能性が高い。そこで、抗酸化作用を有する食品成分で血管新生抑制作用も示す物質を見出し、それらの作用機序を明らかにすることを研究目的の一つとした。更に、抗酸化作用を有する血管新生抑制物質の新規機能としての血管細胞保護作用や脂肪細胞分化への影響を明らかにすることも目的とした。

3. 研究の方法

(1) 抗酸化作用を有する食品機能成分の血管新生抑制効果は、ラット動脈片をコラーゲングル中で3次元培養する方法により検討した。まず、Wistar系ラット (オス、約6週齢、体重約200g) 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の長さの血管を切った。6ウェルプレートに血管片を置き、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) で血管を包埋した。コラーゲンを十分にゲル化させた後、2 mlのRPMI 1640 (1% ITS+を含む) を加え、更に試料を添加した。培養はCO₂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、比較検討した。

(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

(HUVEC) を用いて検討した。検討した血管内皮細胞機能は、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である。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°Cで十分にゲル化させた後、サンプ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 10⁵ cells/ml) 溶液を100 μ l 加えた。CO₂インキュベーター中で18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、一定面積中の管腔長を測定した。血管内皮細胞増殖実験は、次の通りおこ

なった。96ウェルプレートの各ウェルに、血管内皮細胞増殖培地 (HuMedia EG-2) に懸濁した血管内皮細胞 (1.5 \times 10⁴ cells/ml) 溶液を100 μ l 加えた。一晩CO₂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、サンプルを含む血管内皮細胞増殖培地

(HuMedia EG-2) に交換して、CO₂インキュベーター中で3日間培養した。培地をサンプルを含まない血管内皮細胞増殖培地 (HuMedia EG-2) に交換後、WST-1 試薬 (Dojin) を10 μ 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 (VEGF) を含むM199培地 (0.1% 牛血清アルブミン, BSAを含む) 400 μ l を加えた。膜のポアサイズが8 μ mのトランスウェルを0.1%ゼラチンでコートし、サンプルを含む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 \times 10⁵ cells/ml) 溶液400 μ l を入れた。トランスウェルを24ウェルプレートのウェルに入れ、CO₂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) 血管内皮細胞の機能保護作用については、HUVECを用いて検討した。評価方法は、血管内皮細胞の遺伝子発現を解析することにより行った。遺伝子発現は、次の通り行った。サンプルを一定時間血管内皮細胞に暴露させた後、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) 幹細胞からの脂肪細胞分化への影響については、マウス胚性幹細胞 (ES細胞) を用いて検討した。マウスES細胞からの脂肪細胞分化方法は、次の通りである。マウスES細胞を α -MEM培地 (10% FBS, 0.1 mM 2-メルカプトエタノールを含む) に懸濁し (1 \times 10⁴ cells/ml)、非吸着性96ウェルプレートに入れ、CO₂インキュベーター中で2日間培養することにより胚様体を形成させた。胚様体をコラーゲンコートした6ウェルプレートに移し、レチノイン酸処理した後、脂肪細胞分化誘導培地 (α -MEM培地+10% FBS+インスリン+T₃) に交換して分化誘導を行った。培養はサンプル添加後約3週間行い、脂肪細胞分化の評価は、Oil Red染色による脂肪滴形成と定量RT-PCR法による遺伝子発現解析で行った。

4. 研究成果

(1) 抗酸化作用を有する食品成分について、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血管新生抑制作用を検討した。その結果、強力な抗酸化作用を示す海藻カロテノイドの一種フコキサンチンとその代謝物やローズマリーの成分であるカルノシン酸が血管新生抑制作用を示すことを明らかにした。また、抗酸化作用を有する茶カテキンに脂肪酸を結合させることにより、血管新生抑制作用が増強されることも見出した。更には、ビタミン K3 やその誘導体にも血管新生抑制作用を見出した。これらの成分の多くは、健康維持に役立つと考えられている食品成分であり、特に海藻やハーブなどの植物性食品素材に含まれる成分に見つかったことは、他の研究からも示唆されているように、植物性食品の摂取が様々な疾病のリスクを下げることと関連しているかもしれない。

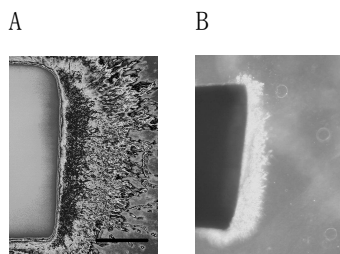


図1 フコキサンチンによる血管新生抑制
(A: コントロール、B: フコキサンチン 25 μM)

(2) 今回見出した抗酸化作用と血管新生抑制作用を有する食品成分の血管新生抑制作用機序を明らかにするために、血管内皮細胞を用いて検討した。その結果、これらの食品成分は、血管新生の主要な過程である血管内皮細胞の管腔形成、細胞増殖、増殖因子による遊走に対して抑制的に作用することが明らかとなった。一方で、各血管新生過程に作用する程度は成分によって異なっており、これが他の生理作用と関連している可能性が示唆された。

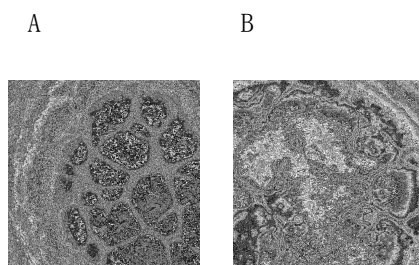


図2 フコキサンチンの血管内皮細胞管腔形成阻害作用
(A: コントロール、B: フコキサンチン 25 μM)

(3) 血管新生の亢進がメタボリックシンドローム発症に深く関与していることから、血管内皮細胞における血管新生関連遺伝子発現に対して、抗酸化作用と血管新生抑制作用を有する食品成分が与える影響を検討した。検討した遺伝子は、血管新生促進因子であるスフィンゴシン 1-リン酸レセプター及び糖尿病時に増加し合併症の進行と関連の深い AGE レセプターである。本研究で検討した成分で、これらのレセプターの遺伝子発現を抑制するものは見つからなかった。一方、血管内皮細胞の酸化ストレス耐性を高める遺伝子 HO-1 の発現については、ビタミン B6 やカルノシン酸が発現を亢進する可能性が示唆された。今後、詳細な検討を進めることにより、これらの物質の有用性を明らかにすることが期待できる。

(4) マウス ES 細胞からの脂肪細胞分化モデルを用いて、抗酸化作用と血管新生抑制作用を有する食品成分の影響を検討した。検討した食品成分は、茶カテキンとフコキサンチンである。その結果、茶カテキンは幹細胞からの脂肪細胞分化に影響を与える可能性が示唆された。特に、脂肪酸の輸送に関与する遺伝子の発現亢進が見られたことから、茶カテキンに暴露して分化する脂肪細胞は、細胞内の脂肪分解速やかに行える可能性が示された。一方、フコキサンチンは脂肪細胞への分化そのものを抑制する可能性が示された。

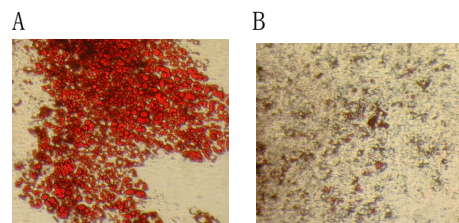


図3 フコキサンチンによる幹細胞からの脂肪細胞分化抑制
(A: コントロール、B: フコキサンチン 10 μM)

以上のように、抗酸化作用を示す食品成分の幾つかに血管新生抑制作用を新たに見出した。これらの成分は、抗酸化作用にとどまらず、肥満予防や糖尿病合併症など様々な病態の予防に有益であり、メタボリックシンドロームの発症を予防する可能性を示唆するものである。また、これらの成分の多くは、経験的に健康に有益な成分だと考えられており、その根拠の一端を科学的に証明できたと言える。これらの成果をもとに、メタボリックシンドロームをはじめ、血管病や関連する様々な疾病予防に対する有効性について更に検討を進める予定である。

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4件)

- ① Kayashima, T., Mori, M., Yoshida, H., Mizushina, Y., Matsubara, K. 1,4-Naphthoquinone is a potent inhibitor of human cancer cell growth and angiogenesis. *Cancer Lett.*, **278**, 34-40, 2009. 査読有り
- ② Matsubara, K., Kayashima, T., Mori, M., Mizushina, Y. Inhibitory effects of vitamin K3 on DNA polymerase and angiogenesis. *Int. J. Mol. Med.*, **22**, 381-387, 2008. 査読有り
- ③ Matsubara, K., Saito, A., Tanaka, A., Nakajima, N., Akagi, R., Mori, M., Mizushina, Y. Epicatechin conjugated with fatty acid is a potent inhibitor of DNA polymerase and angiogenesis. *Life Sci.*, **80**, 1578-1585, 2007. 査読有り
- ④ Sugawara, T., Matsubara, K., Akagi, R., Mori, M., Hirata, T. Antiangiogenic activity of brown algae fucoxanthin and its deacetylated product, fucoxanthinol. *J. Agric. Food Chem.*, **54**, 9805-9810, 2006. 査読有り

[学会発表] (計8件)

- ① 平成21年度日本農芸化学会大会, カルノシン酸の血管新生抑制作用, 萱島知子・水品善之・松原主典, 平成21年3月29日, 福岡
- ② The 2nd International Interdisciplinary Conference on Vitamins, Coenzymes, and Biofactors, Dietary vitamin B6 suppresses colon heat shock proteins, targets for cancer therapy, in 1,2-dimethylhydrazine-treated rats. Kayashima, T., Tanaka, K., Matsubara, K., Yanaka, N., Kato, N., October 30, 2008., Athens, Georgia, USA.
- ③ 2nd World Congress on Magic Bullets, Vitamin K3 is a potent inhibitor of angiogenesis and DNA polymerase. Matsubara, K., Kayashima, T., Mizushina, Y., October 4, 2008, Nurnberg, Germany.
- ④ 平成20年度日本食品科学工学会, キノン系化合物の血管新生抑制作用, 萱島知子・松原主典・水品善之, 平成20年9月6日, 京都
- ⑤ 平成20年度日本農芸化学会大会, ビタミンK3の血管新生抑制作用に関する検討, 萱島知子・松原主典・水品善之, 平成20年3月28日, 名古屋
- ⑥ 平成19年度日本栄養・食糧学会中四国・近畿支部合同大会, 血管新生抑制作用を有す

る機能成分の新展開, 松原主典, 平成19年11月17日, 広島

- ⑦ 平成19年度日本家政学会中国・四国支部大会, ビタミンB6が血管新生関連遺伝子発現に与える影響についての検討, 萱島知子・中澤昇映・松原主典・加藤範久, 平成19年10月14日, 広島
- ⑧ 平成19年度日本水産学会春季大会シンポジウム, カロテノイドと血管新生, 松原主典, 平成18年3月31日, 東京

[図書] (計2件)

- ① Matsubara, K. Green tea catechin as angiogenesis inhibitors. In Handbook of Green Tea and Health Research, Nova Science Publishers, Inc., New York, USA, in press.
- ② カロテノイドと血管新生抑制, 松原主典, pp92-102, 水産物の色素-嗜好性と機能性, 平田孝・菅原達也編, 恒星社厚生閣, 2008

[産業財産権]

○出願状況 (計1件)

名称: 血管新生抑制剤
発明者: 松原主典, 萱島知子
権利者: 国立大学法人広島大学
種類: 特許
番号: 2008-258859
出願年月日: 平成20年10月3日
国内外の別: 国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松原 主典 (MATSUBARA KIMINORI)
広島大学・大学院教育学研究科・准教授
研究者番号: 90254565

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者