

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 15 日現在

機関番号：32669

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010 ～ 2011

課題番号：22780243

研究課題名（和文） 畜産資源を由来とする血管再生因子の探索と作用機序の解明

研究課題名（英文） The search for vascular regeneration factor derived from the livestock resources and the elucidation of its mechanisms.

研究代表者

江草 愛 (EGUSA AI)

日本獣医生命科学大学・応用生命科学部・助教

研究者番号：90521972

研究成果の概要（和文）：

高血圧は血管内皮を損傷し、脳梗塞や心筋梗塞などの重篤な循環器疾患の一因となる。我々はこれまでに、鶏コラーゲン加水分解物を摂取すると、高血圧自然発症ラット(SHR)において血圧の上昇抑制作用や、正常高値ならびに軽症高血圧者(ヒト)において同じく血圧上昇抑制作用を見出してきた。また、これらの研究の中で、鶏コラーゲン加水分解物の摂取により血管内皮前駆細胞の活性化(増殖)を見出してきた。そこで本研究では、①畜種が異なる加水分解物(豚コラーゲンやカゼイン)ならびに鶏コラーゲン加水分解物のNativeな状態(鶏ゼラチン)でも同様な効果が得られるのか、また、②その作用機序が何によるのか、の2点について検討を行ってきた。具体的には高血圧自然発症ラット(SHR)を用いて、鶏ゼラチン或いは、鶏コラーゲン、豚コラーゲンおよびカゼインから調製した加水分解物をそれぞれ7週間投与し、SHRから血管内皮前駆細胞(EPC)および血清と各種組織(肝臓、心臓、腎臓、血管)を得た。各飼料を投与した際の腎臓の影響を確認するため、血清中の腎臓マーカー( $\beta$ -Microglobulin、Calbindin、TIMP-1、VEGF、KIM-1、Cystatin、Osteopontin等)の測定を実施した。また、腎臓と心臓からはm-RNAを抽出し、各種サイトカイン(CD34、Flk-1、NOS3等)のリアルタイムPCRを行った。その結果、腎炎症マーカーでは、豚コラーゲン加水分解物区で、対照と比較してTIMP-1が約1.2倍に有意に増加する項目が認められたものの、その他の項目では大きな違いは認められなかった。一方、リアルタイムPCRの結果から、ゼラチン区と鶏コラーゲン加水分解物区では、EPCのマーカーであるCD34とFlk-1に約2倍から約1.5倍の有意な増加が認められた。また、カゼイン加水分解物区ではFlk-1とNOS3の発現が有意に増加した(それぞれ2倍と8倍)。各飼料の投与によるEPCの活性化をより明確にするため、末梢血から調製したEPCに各飼料を投与したラット血清を添加して、メチルセルロース培地で培養したところ、鶏コラーゲン加水分解物区ではEPCの有意な増殖が認められ、さらにカゼイン加水分解物区ではEPCから脈管形成により初期血管の形成が確認された。

今回の結果から、鶏コラーゲン加水分解物の摂取はEPCの増殖を活性化し、さらにカゼイン加水分解物はEPCの血管内皮細胞への分化を誘導することが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：

High blood pressure injures blood vessels and can cause cerebral and myocardial infarction. In our previous studies, chicken collagen hydrolysate has shown antihypertensive effects in spontaneously hypertensive rats (SHRs) and mildly hypertensive human subjects. Moreover, our recent study showed that chicken collagen hydrolysate ameliorates vascular injury through endothelial progenitor cell (EPC) activation. The purpose of our current study was twofold: first, to observe whether we could obtain the same results as above using different live resources and/or native gelatin; and second, to clarify the mechanism of action of chicken collagen hydrolysate. SHRs were fed chicken collagen hydrolysate, porcine collagen hydrolysate, or chicken gelatin for 7 weeks. EPCs, sera, organs (liver, heart, kidneys), and vascular tissues were collected from the SHRs. Kidney markers were investigated to clarify the effect of

administration of each substance on the kidney. mRNAs were isolated from the kidney and heart to measure the expression levels of various cytokines. On administration, none of the substances caused changes in the levels of markers of renal injury except for porcine collagen hydrolysate (TIMP-1). However, chicken collagen hydrolysate increased the mRNA levels of the EPC markers CD34 and Flk-1. Casein hydrolysate significantly elevated the mRNA levels of Flk-1 and NOS3.

To clarify the mechanisms by which these two substances induced EPC activation, EPCs were cultured with sera prepared from rats fed the test substances. Chicken collagen hydrolysate enhanced EPC colony formation, and casein hydrolysate promoted early vasogenesis.

These results suggest that administration of chicken collagen hydrolysate activates EPC migration, and that administration of casein hydrolysate induces the differentiation of EPCs into endothelial cells.

#### 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
総計	1,700,000	510,000	2,210,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・畜産物利用学

キーワード：食品・循環器・高血圧

#### 1. 研究開始当初の背景

高血圧・糖尿病・高脂血症を始めとする生活習慣病は、その予備軍を含めると国民の1/6が罹患していると見込まれており、国民の健康のために緊急かつ重要な課題と位置づけられる。生活習慣病は血管の機能不全を引き起こし、心筋梗塞や脳梗塞など死に直結する恐れが高い。血管は生体内の全組織に酸素や栄養分を供給し、老廃物を排泄器官に戻す重要な役割を担っているため、生体が健全な状態であるためには、血管が正常に機能しなければならない。

これまで我々は、生活習慣病予防研究の中で鶏エキスを原料とした血圧上昇抑制効果に着目し、研究を進めてきた。鶏エキスは、古来から中国や韓国において血流改善や虚弱体質の改善を目的とした薬膳に利用され、欧米でも“Granma's remedy”として伝統的に使われている。つまり、鶏エキスには循環器疾患に何らかの薬理作用を示す成分が含まれていることが考えられる。我々は、鶏ムネ肉抽出物が高血圧自然発症ラット(SHR)の血圧上昇抑制作用を有することを見出し、昇圧作用を司るアンジオテンシン変換酵素(ACE)の阻害作用を有するペプチドの構造を明らかにしてきた。このペプチドはコラーゲン由来であったため、より効率的にACE阻害ペプチドを作出することを目的とし、畜産資源の中でも利用率の低い鶏足から抽出した

コラーゲンを加水分解した物を使用した。本加水分解物はSHRならびに軽症高血圧患者の血圧を下げたのみならず、ヒトで末梢血中の血管内皮前駆細胞(EPC)のコロニー形成能を増加させた。EPCは虚血等で傷ついた血管において、血管内皮細胞へ分化し、修復を司る。高血圧症をはじめとする生活習慣病患者ではEPCの活性が低下していることが報告されていることから、生活習慣病が引き金となる血管不全の予防には本ペプチドが有効であると考えられる。

#### 2. 研究の目的

前述の鶏コラーゲン加水分解物の経口摂取で得られた効果について、①他の畜種由来のペプチドでは同様の効果が期待できるのか、②その作用機序は何か、を明らかにすることを目的とした。

#### 3. 研究の方法

8週齢の雄性SHRを用いて、鶏ゼラチン(CGN)、鶏コラーゲン加水分解物(CCH)、豚コラーゲン加水分解物(PCH)およびカゼイン加水分解物(CNH)を4%食塩負荷食と共に、それぞれ7週間摂食させた。試験期間終了後、各試験区のSHRから血管内皮前駆細胞(EPC)および血清と各種組織(肝臓、心臓、腎臓、血管)を得た。各飼料を摂取した際の腎臓の影響を確認するため、血清の腎臓マーカー( $\beta$

-Microglobulin、Calbindin、TIMP-1、VEGF、KIM-1、Cystatin、Osteopontin等)の測定を実施した。また、腎臓と心臓からはmRNAを抽出し、各種サイトカイン(CD34、Flk-1、NOS3、angiotensinogen等)のリアルタイムPCRを行った。また、EPCの活性化測定には、ラット全血から採集したEPCを100nMアンジオテンシンIIで処理し、各試験区の血清を添加後、メチルセルロース培地に播種し、形成されたコロニー数をカウントすると共に形態を観察した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 各加水分解物摂取による体重ならびに組織重量への影響

各試験区ならびに対照区の結果を、図1に示す。各区で有意な体重差は、認められなかった。続いて、組織重量の比較を表1に示す。こちらでも体重同様に、各試験区間での違いは認められなかった。

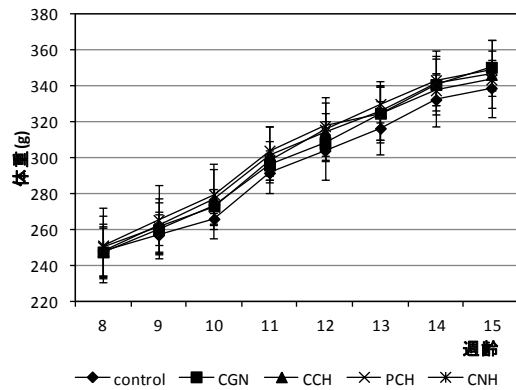


図1. 各群間での体重変動

表1. 組織重量の比較

	心臓重量(g)	腎臓重量(g)	心臓/体重(%)	腎臓/体重(%)	大動脈(mg/cm)
control	1.37±0.12	1.12±0.12	0.41±0.03	0.33±0.04	11.6±0.71
CGN	1.45±0.07	1.17±0.10	0.43±0.02	0.34±0.03	15.0±3.08
CCH	1.39±0.08	1.17±0.04	0.41±0.04	0.34±0.01	13.3±1.60
PCH	1.41±0.06	1.23±0.09	0.42±0.02	0.36±0.03	13.4±1.39
CNH	1.51±0.24	1.21±0.15	0.43±0.06	0.35±0.04	14.3±2.36

##### (2) 血清中の腎臓マーカーの比較

次に、血清中の腎臓マーカーの結果を表2に示す。対照と比較して豚の腎炎症マーカー(TIMP-1)で約1.2倍に有意に増加する項目が認められたものの、大きな違いは認められなかった。

表2. 各群での腎臓マーカーの比較

	Clusterin (μg/ml)	KIM-1 (pg/ml)	NGAL (ng/ml)	GST-α (ng/ml)	GST-Mu (ng/ml)
control	139.3±27.2	164.0±6.9	82.4±26.5	91.3±32.7	310.7±161.8
CGN	140.1±71.0	145.0±23.0	72.4±22.7	124.3±49.0	442.0±225.8
CCH	183.0±13.5	156.3±30.2	67.3±8.7	165.0±42.7	536.0±240.1
PCH	125.9±43.1	183.3±6.7	104.5±21.5	85.0±64.1	359.2±273.0
CNH	187.0±9.6	175.7±13.3	63.5±9.5	140.0±25.9	445.3±93.9

	B2microglobulin (μg/ml)	Cystatin-C (ng/ml)	TIMP-1 (ng/ml)	Osteopontin (ng/ml)	VEGF-A (ng/ml)
control	13.7±2.3	530.7±59.2	6.1±0.3	22.1±5.2	128.6±54.1
CGN	17.3±9.7	537.3±142.7	6.5±0.5	16.7±9.2	157.7±38.1
CCH	11.3±2.6	556.7±43.4	5.7±0.2	26.8±5.2	135.3±6.4
PCH	21.9±4.7	563.0±213.4	8.4±1.5	27.5±7.3	277.3±173.7
CNH	10.9±0.4	592.3±54.1	6.5±0.1	26.2±4.2	146.7±33.2

##### (3) 血管系遺伝子の発現量の比較

血管系細胞で発現が認められるタンパク質や表面抗原の遺伝子発現量の結果を図2, 3, 4, 5に示す。

##### CD34

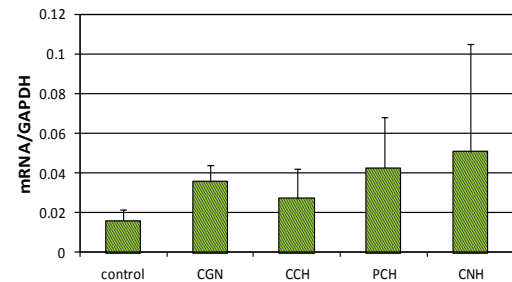


図2. CD34の遺伝子発現量の比較

CD34はEPCの指標としても用いられている細胞表面抗原である。対照区に比べ、各区で遺伝子発現量の増加が認められたが、特に鶏ゼラチン区と鶏コラーゲン加水分解物区で有意な増加となった。

##### Flk1

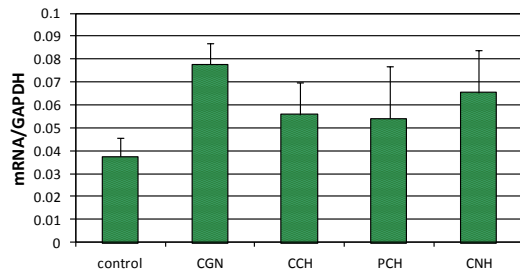


図3. Flk-1の遺伝子発現量の比較

VEGF(血管内皮増殖因子)のレセプターであるFlk-1もEPCの指標にされている。CD34と同様に対照区に比べて、各区で遺伝子発現量の増加が認められ、特に鶏ゼラチン区、鶏コラーゲン加水分解物区とカゼイン区で有意な増加が認められた。

##### NOS3

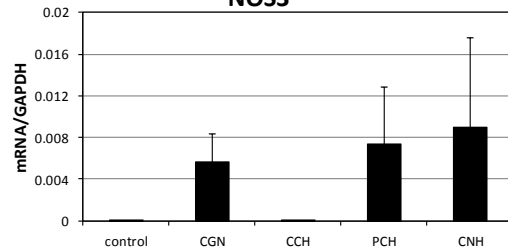


図4. NOS3の遺伝子発現量の比較

血管拡張因子である一酸化窒素(NO)合成酵素の遺伝子発現量は、鶏コラーゲン加水分解物区で対照区と違いは認められなかったが、カゼイン区で有意な増加が認められた。

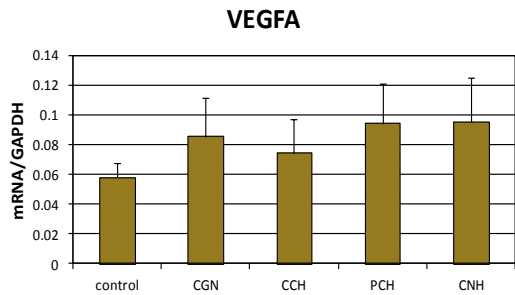


図 5. VEGF の遺伝子発現量の比較

カゼイン区で血管内皮細胞増殖因子である VEGF の遺伝子発現量の有意な増加が認められた。

(4) コロニー形成能の比較

最後に、EPC コロニーアッセイの結果を図 6 に示す。鶏コラーゲン加水分解物区で有意なコロニー形成増加が認められた他、カゼイン区では、さらに初期血管の形成が認められた(図 7)。

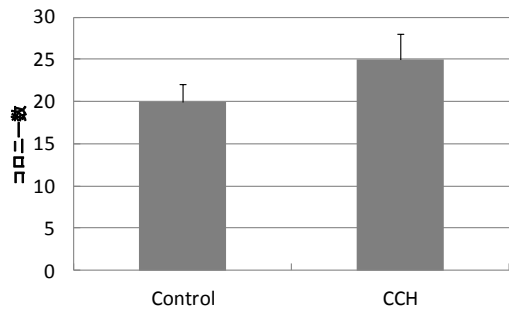


図 6. コロニー数の比較

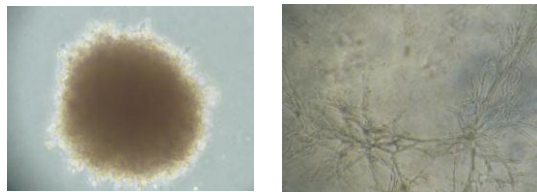


図 7. EPC コロニー(左)とカゼイン加水分解物投与による血管形成(右)

以上の結果から、鶏コラーゲン加水分解物の摂取は VEGF レセプターの増加を通して EPC の増殖を活性化し、さらにカゼイン加水分解物は VEGF の産生を促進することで、EPC の血管内皮細胞への分化を誘導すると推察された。

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)

- ① 江草(雑賀)愛、國分由希、小熊敦之、西村敏英、鶏コラーゲン加水分解物の摂取

が食塩負荷 SHR の腎臓と血管細胞に与える影響、2012 年度日本農芸化学会大会 4J13a08

- ② 國分由希、江草(雑賀)愛、西村敏英、起源の異なるタンパク質加水分解物の投与が食塩負荷 SHR の循環器系へ与える影響、第 56 回日本栄養・食糧学会講演要旨集 pp.215

6. 研究組織

(1) 研究代表者

江草 愛 (EGUSA AI)

日本獣医生命科学大学・応用生命科学部・助教

研究者番号：90521972

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし