

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 18 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592438

研究課題名(和文)植物ホルモンによるヒト血管内皮機能制御に関する基礎的検討

研究課題名(英文)S-equol regulates endothelial function

研究代表者

尾林 聡(OBAYASHI, SATOSHI)

東京医科歯科大学・医歯(薬)学総合研究科・准教授

研究者番号：10262180

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：女性では閉経後に動脈硬化が増加するが、これはエストロゲン低下により内皮機能が変化するためと考えられている。植物エストロゲンとして知られるequolは大豆より生成されるが、我々は血管壁に対する作用をイソフラボン欠乏状態となる特殊飼料を使用して卵巣摘出モデル動物を作成し、徐放ポンプによる4週間のequol投与を行い、エストロゲン群および無投与群と比較した。等尺性張力変化の測定を用いた内皮由来の一酸化窒素の産生能はエストロゲン群とequol群で亢進し、この変化は2nd messengerでも確認され、equolはイソフラボン欠乏時において内皮機能改善作用を有すると考えられた。

研究成果の概要(英文)：Estrogen has a key role to regulate endothelial function through releasing nitric oxide (NO). The aim of this study was to evaluate the effect to regulate NO of S-equol on rat carotid arterial endothelium. Sprague-Dawley rats underwent abdominal ovariectomy and were fed by soy-bean free diet, AIN-93G for 2 months in order to eliminate the effect of endogenously created S-equol. Alzet osmotic pumps containing estradiol, S-equol or DMSO (Control group) were subcutaneously implanted and all rats were sacrificed at 20th week, and the relaxant responses to ACh, A23187 and SNP were measured. In carotid artery, ACh induced relaxation was completely mediated with endothelium derived NO and this response was enhanced in both estradiol group and S-equol group. These results suggested that S-equol increased endothelium-derived relaxing factor as well as E2 without increasing uterine weight, and that S-equol might regulate endothelial function and have a possibility to reduce atherosclerosis.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学 産婦人科学

キーワード：equol estrogen nitric oxide endothelium

### 1. 研究開始当初の背景

更年期における女性ホルモン分泌の減少は脂質・糖質などの代謝に種々の影響を与えるため、閉経後には高脂血症や糖尿病と関連する循環器系疾患が増加し、さらに動脈硬化に大きく関与する血管内皮機能の低下も生じると考えられている。治療としてはホルモン補充療法(HRT)が有効であるが、HRTは子宮内膜癌、乳癌リスクの増加などの副作用の問題から、標的組織にのみ有益な作用を示す次世代型SERM(選択的estrogenモジュレーター)として植物エストロゲンが注目されている。

植物エストロゲンは植物に含まれエストロゲンと似た化学構造を有し、エストロゲン受容体に特異的に結合し活性を示す物質である。エストロゲンが低値の場合には弱いエストロゲン様作用を示すが、高値の場合には抗エストロゲン作用を示し、また、その生理的活性はエストロゲンよりはるかに弱いと考えられているが、とくにイソフラボン欠乏状態での生理的役割に関する報告は未だない。

植物エストロゲンの1つである daidzein は腸内細菌の作用により equol に代謝されるが、この equol は daidzein よりも強力なエストロゲン様活性を示し、super oxide 由来の酸化ストレスに対する抗酸化作用や血管機能改善作用も有することが報告されている。

### 2. 研究の目的

本研究は、イソフラボン欠乏状態の血管内皮に対する S-Equol 単独の作用を調べるために、卵巣摘出した SD ラットの頸動脈標本における等尺性張力変化を指標とし、また内膜肥厚形成に対する抑制効果も検討した。同時に体重、子宮重量の計測を行い、S-Equol の SERM としての特性の解明を明らかにすることを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) イソフラボン欠乏ラット

ラットは雌の SD ラットを用いた。12週で麻酔下で卵巣摘出し、術後2~3日は通常の飼料(CE-2:日本クレア株式会社)を与え、それ以降は大豆の影響を防ぐために大豆非含有特殊飼料 AIN-93G(オリエンタル酵母工業株式会社)を与えて飼育した。16週で無作為に溶媒のみを投与する Control 群、17 $\beta$ -estradiol (E<sub>2</sub>) 投与群(7 $\mu$ g/day)、S-Equol 投与群(0.2mg/day)の3群に分け、MINI-OSMOTIC PUMP (DURECT Corporation)を背部皮下へ埋め込み、20週で脱血による sacrifice を行った。体重は偶数週で測定し、子宮重量は sacrifice 後取り出し測定した。これらすべての実験は東京医科歯科大学の動物実験倫理委員会の承諾(0130016A)のもとで行われた。

(2) 17 $\beta$ -estradiol、S-Equol 血中濃度測定  
Sacrifice 時に採血し、1500rpm で10分間遠心後血清のみ取り出し、液体窒素で急速凍結後-80℃で保存した。17 $\beta$ -estradiol は radioimmunoassay(RIA)法により測定し、S-Equol はガスクロマトグラフィーによる測定を行った。

(3) 頸動脈における等尺性張力変化の測定  
20週で行った sacrifice の際にラット頸動脈を摘出し、血管周囲の結合組織を除去し幅1mmに切断し、輪状標本を作製、イメージマグナス(岸本医科産業株式会社)にセットし、トランスデューサー(日本光電工業株式会社)を介して出力した。その後、37℃の modified krebs 溶液中(NaCl 118.0 mM, KCl 4.7 mM, MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 1.2 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.2 mM, NaHCO<sub>3</sub> 25.0 mM, CaCl<sub>2</sub> · 2H<sub>2</sub>O 2.5 mM, Glucose 10.0 mM)で静止張力0.25gをかけ、95% O<sub>2</sub> 5% CO<sub>2</sub>をバブリングして平衡状態を1時間維持し、等尺性張力変化を測定した。張力変化の記録はペンレコーダー(理化電機工業株式会社)により行った。使用した薬剤は収縮剤として U46619 (10<sup>-7</sup>M) を使用し、内皮依存性弛緩剤として acetylcholine (Ach) を、内皮非依存性弛緩剤として sodium nitroprusside (SNP) を 10<sup>-9</sup>M~3×10<sup>-5</sup>M まで累積投与し、さらにカルシウムイオノファである A23187 も 3×10<sup>-6</sup>M で投与した。また、阻害剤として NO 合成酵素阻害剤の N<sup>G</sup>-nitro-L-arginine (LNA:10<sup>-4</sup>M) を15分間前処置した。標本セッティング1時間後に、norepinephrine (10<sup>-6</sup>M)と Ach (10<sup>-6</sup>M) でテストショックを行い、再び平衡状態にした後に各種反応を行った。弛緩反応は U46619 による前収縮に対する弛緩の比として算出した。また Ach 誘発弛緩反応において、最高弛緩の50%弛緩における濃度 Half Maximal Effective Concentration (EC<sub>50</sub>) も算出した。

#### (4) Cyclic GMP の測定

頸動脈組織を湿重量で3~4mgで2本に切断し、2mLの Krebs 溶液中で一方に LNA (10<sup>-4</sup>M) を入れ、20分培養した後、phosphodiesterase 阻害剤である IBMX (3-isobutyl-1-methylxanthine : 10<sup>-5</sup>M) で20分さらに培養し、U46619 (10<sup>-7</sup>M) により15分刺激した後、Ach (10<sup>-6</sup>M) で10分間刺激し、すべて同じ時間経過で液体窒素により組織を急速凍結し、反応を停止させ保存した。Cyclic GMP の抽出は 10% Trichloroacetic acid (TCA) 中で Tissue Lyser LT (株式会社キアゲン) を用いてホモジネートした後に、4 10000g で20分遠心し上清を分離、5倍量の水飽和エーテルにて中和し、凍結乾燥した後に Chemiluminescent Immunoassay Kit (ARBOR ASSAYS) を用いて Cyclic GMP の組織内含有量を検討した。また、遠心後の沈渣は 1N の NaOH 300 $\mu$ L に溶解し

て蛋白量を Micro BCA Protein Assay kit (Thermo science) を用いて測定した。組織中 Cyclic GMP 含有量は蛋白量で補正した値を用いた。

#### (5) 頸動脈肥厚モデル

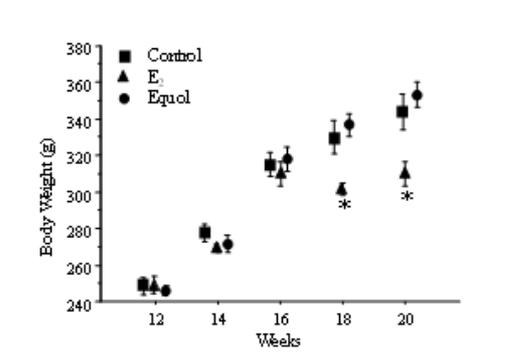
ポンプの埋め込みから 2 週間後に再び Ketamine (80mg/kg)、Xylazine (8mg/kg) の筋注麻酔下で左総頸動脈の内皮剥離を行った。左外頸動脈から 2Fr Fogarty Arterial Embolectomy Catheter (Edwards lifescience) を挿入し、左総頸動脈に到達した時に 0.175mL の air によりバルーンを膨らました状態で左総頸動脈 3 往復する。その 2 週間後、同様のプロトコルで Ach ( $10^{-6}M$ ) 投与による等尺性張力変化に加え、内皮剥離した組織をホルマリンに保存し、組織標本を作成し、EVG 染色を行った。組織標本は PC に取り込み、Image J program (NIH) によって内膜、中膜の面積比(intima/media ratio : I/M)を測定し、内膜肥厚の評価を行った。

### 4. 研究成果

#### (1) 体重と子宮重量

16 週におけるポンプ埋め込み後、E<sub>2</sub> 群では 20 週まで体重はほとんど変化しなかったが、Control 群、Equol 群では時間経過とともに体重は増加した。また、20 週における体重補正後の子宮重量は E<sub>2</sub> 群でのみ他の群よりも有意に増加していた

図 1 : 3 群間における体重変化



#### (2) NO 産生能の変化

U46619 誘発前収縮中に Ach の累積投与を行うと、濃度依存性の弛緩反応が惹起され、この反応は内皮剥離標本において消失した。Ach を累積投与した結果、Control 群と比較して、Equol 群、E<sub>2</sub> 群で有意に弛緩が増強され、EC<sub>50</sub> も同様に E<sub>2</sub> 群、Equol 群は Control 群に比べ、有意に低い値だった。またこの弛緩反応は LNA の前処置によってほぼ消失した。A23187 誘発の弛緩反応でも同様に、Control 群に対し、Equol 群、E<sub>2</sub> 群で有意に弛緩が増強され、この弛緩反応も LNA の前処置によってほぼ消失した。一方、SNP による弛緩は 3 群で差は見られなかったことから、Ach で見られた変

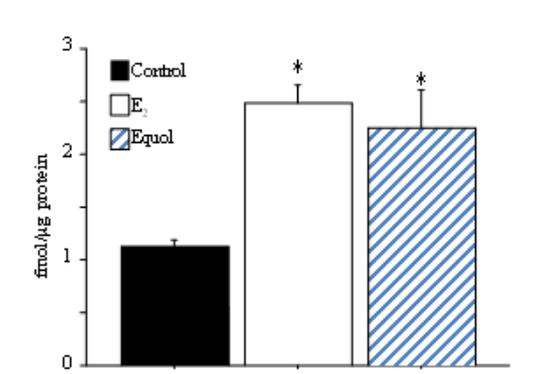
化は内皮由来の NO 産生能の変化であると考えられた。

また受容体非依存性の刺激である A23187 誘発の弛緩反応でも同様に、Control 群に対し、Equol 群、E<sub>2</sub> 群で有意に弛緩が増強され、この弛緩反応も LNA の前処置によってほぼ消失した。

#### (3) Cyclic GMP 量

Ach ( $10^{-6}M$ ) による刺激 10 分後における組織中 cyclic GMP 含量を測定したところ、Control 群に対し、E<sub>2</sub> 群、Equol 群で有意に増加し、3 群間の張力変化における NO 産生能と同等であった (図 2)。

図 2 : 3 群間の cGMP 量の比較

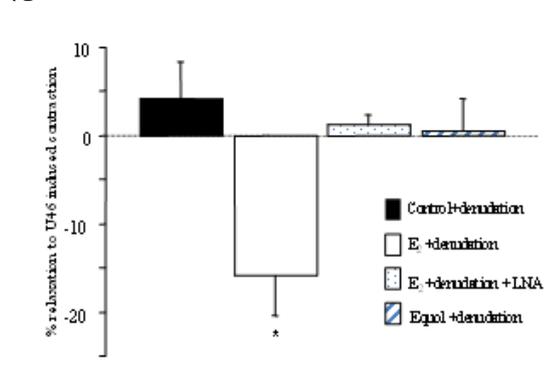


#### (4) 内皮剥離操作による変化

内皮剥離を行った血管組織に対して Ach ( $10^{-6}M$ ) 投与を行うと、E<sub>2</sub> 群にのみわずかな弛緩反応が観察され、この弛緩反応も LNA 前処置により消失した (図 3)。

内皮剥離を行った左頸動脈では内膜肥厚が全ての標本で見られたが、肥厚の程度を調べるために、内膜と中膜の面積比 (I/M) を測定したところ、E<sub>2</sub> 群でのみ有意に内膜肥厚が抑制された。

図 3 : 内皮剥離標本における Ach 誘発弛緩反応



#### (5) 考案

血管内皮では Acetylcholine (Ach) 等のアゴニストが内皮細胞の受容体に結合すると、細胞内 Ca 濃度が上昇し、内皮細胞において NO 合成酵素 (NOS) などが活性化される。NOS の活性化により内皮より強力な動脈硬化抑制物質である NO が産生・遊離され guanylate

cyclase の活性化を介して、cyclic GMP の産生を亢進させることで血管平滑筋が弛緩する。

Equol 投与では E2 とは異なり、ラットの体重や子宮重量に変化は見られず、これは SERM (estrogen 受容体モジュレーター) としての特性と考えられた。また頸動脈の内皮剥離標本では Ach による弛緩反応が消失し、また LNA 前処置によっても消失した。さらに NO のドナーである SNP での弛緩では差が見られなかったため、3 群における平滑筋の NO 感受性には変化がないと考えられ、Ach による弛緩反応は内皮依存性の NO による反応と考えられた。3 群間での弛緩反応を比較すると Control に比して E2 および Equol 群では Ach 刺激による NO 産生が亢進しており、これは NO の 2nd messenger である cyclic GMP の組織内濃度からも裏付けられた。

バルーンにより内皮剥離した標本における Ach 誘発弛緩反応では、E2 群でのみ弛緩反応がわずかに回復し、このことから、内皮剥離後の E2 群では内皮の再生および、NO 産生亢進が生じるのに対し、Control 群、Equol 群では内皮の再生が起きなかったと考えられた。E2 における内皮再生機序については、過去の研究で、E2 による内皮の再生はエストロゲンレセプター を介して起きるという報告がある。しかし、植物性のエストロゲンである S-Equol などはエストロゲンレセプター に対してのみ強い選択的親和性を持つことが報告されていることから、今回の結果のように内皮の再生が明らかではないと考えられる。

以上より S-Equol は子宮重量の変化を生じることなく、E2 同様に血管内皮の NO 産生能を増強し、動脈硬化に抑制的に働くが、E2 とは異なり、内皮剥離による肥厚モデルにおいては内皮再生能の欠落が示唆された。

## 5 . 主な発表論文等

[学会発表](計 7 件)

(1) Obayashi S, Okura Y, Kubota T. et.al, Enhanced vasorelaxation in ovariectomized rat tail artery with S-equol supply. 16<sup>th</sup> North American Menopause Society, Dallas USA, 2013.10.9-12

(2) Okura Y, Obayashi S, Kubota T. et.al., S-equol increases NO production of thoracic aorta in ovariectomized rats. 16<sup>th</sup> North American Menopause Society, Dallas USA, 2013.10.9-12

(3) Obayashi S. Humoral regulation of endothelial function and atherosclerosis. 5<sup>th</sup> Scientific Meeting of the Asia Pacific Menopause Federation, symposium 5, Tokyo, Japan.2013.10.18-20

(4) Obayashi S. Role of s-equol, an end product of isovlavone on endothelium and endometrium. Special research presentation, Dept of Pediatrics, UT southwestern medical center, Dallas, USA 2013.10.11

(5) Okura Y, Obayashi S, Kubota T. et.al., S-equol increases nitric oxide production of rat thoracic aorta endothelium. 5<sup>th</sup> Scientific Meeting of the Asia Pacific Menopause Federation, Tokyo, Japan. 2013.10.18-20

他 2 回

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

尾林 聡 (Satoshi OBAYASHI)

東京医科歯科大学・医歯(薬)学総合研究科・准教授

研究者番号：10262180

### (2)研究分担者

久保田俊郎 (Toshiro KUBOTA)

東京医科歯科大学・医歯(薬)学総合研究科・教授

研究者番号：50126223

### (3)連携研究者

寺内 公一 (Masakazu TERAUCHI)

東京医科歯科大学・医歯(薬)学総合研究科・准教授

研究者番号：90361708