

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24780130

研究課題名(和文)血管弛緩を加速する食品成分混合系の解明

研究課題名(英文)Study on the synergistic enhancement of food compounds on vasorelaxation effect

研究代表者

田中 充(Tanaka, Mitsuru)

九州大学・(連合)農学研究科(研究院)・助教

研究者番号：70584209

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、相乗的血管弛緩作用の発現を可能とする食品成分混合系を明らかにすることを目的とした。まず、動脈硬化予防ペプチドTrp-Hisと血管弛緩性ポリフェノールであるEGCgによる相乗的血管弛緩作用には、血管内皮依存的なNO産生系シグナルが重要であることを明らかとした。さらに、炎症血管においては、Trp-His/EGCgの血管弛緩作用が減弱すること、及びフェルラ酸の添加によりその減弱が回復することを明らかとした。その回復機構には、TNF- $\alpha$ 炎症刺激により減弱したアルギニノコハク酸合成酵素の発現回復が重要であることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：The aim of the present study was to elucidate the mechanism of synergistic enhancement of vasorelaxation by food compounds. It was demonstrated that vasorelaxation of anti-atherosclerotic di-peptide, Trp-His, was synergistically enhanced by the epigallocatechingallate through their enhancement of NO production signals. The present study also showed that the synergistic vasorelaxation by Trp-His/EGCg was attenuated by a pro-inflammatory cytokine TNF- $\alpha$  treatment, and the attenuated vasorelaxation was restored by a widely present natural phenolic acid, ferulic acid.

研究分野：食品分析学

キーワード：食相乗性 ペプチド ポリフェノール 血管機能

1. 研究開始当初の背景

健康維持を目的とした機能性食品は我が国が世界に先駆けて提案した概念であり、現在では「Functional Food」として世界的に認知されている evidence-based food である。その開発戦略は、目的とする機能を有する素材に含まれる当該活性の高い成分（あるいは画分）を精製・抽出し、機能本体と考えられる成分を単離した後に、その生理作用を評価するものである。しかしながら、実際の機能性画分には、活性本体とされる成分以外にも多数の機能性成分が存在するため、それらが関与成分の活性発現に深く関わっている可能性は十分にある。従って、食機能研究において、表現形として発現する本質的な機能性を評価するためには、共存する活性成分間の相互作用を解析することが必要不可欠であると考えられる。これまで食品成分による成分間相互作用（相乗作用）発現に関する研究は、抗酸化成分 (*J. Agric. Food Chem.* 58, 209-17, 2010) については検討されているが、その他の生体調節成分に関する研究例はない。

2. 研究の目的

これまでの機能性食品の主流であった 1 成分による 1 疾病対応型研究を覆し、多成分混合系である食品でこそ達成可能な機能、すなわち複数成分による相乗的疾病予防作用を明らかにする。本研究では、血管機能改善作用を有する食品成分に着目し、既に明らかとしている低分子ペプチドとポリフェノールとの相乗効果に関するメカニズム解明を試みる。本食相乗性により、機能性成分の当該機能発現のための必要摂取量を大幅に低減可能であり、吸収性の低い成分であっても十分な生理作用発現が期待できる。

3. 研究の方法

血管機能の評価の評価は、8-11 週齢雄性 SD 系ラット由来胸部大動脈血管を用いて、1  $\mu\text{M}$  フェニレフリン収縮血管における張力測定により行った。

4. 研究成果

(1) Trp-His/EGCg による相乗的血管弛緩作用の作用機序解明

これまでの研究において、動脈硬化予防低分子ペプチド低分子ペプチド Trp-Hisの血管弛緩作用が、血管弛緩性ポリフェノールであるエピガロカテキンガレート (EGCg : 300  $\mu\text{M}$ ) により相乗的に増強される (約 6 倍の活性増大) ことを明らかとしてきた。そこで、Trp-HisとEGCgとの相乗的血管弛緩作用発現

に関わるメカニズムの解明を試みた。

まず、血管内皮除去血管におけるTrp-HisとEGCgの併用添加による血管弛緩作用を評価したところ、インタクトな血管におけるTrp-HisとEGCgの相乗的血管弛緩作用は、内皮除去血管において完全に消失することが明らかとなった (図1)。

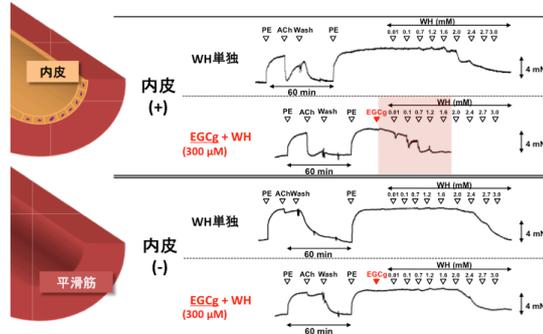


図1. Trp-His/EGCgの血管弛緩作用における内皮の影響

また、内皮型NO合成酵素 (eNOS) 阻害剤 (L-NMMA : 100  $\mu\text{M}$ ) あるいは可溶性グアニル酸シクラーゼ阻害剤 (ODQ : 10  $\mu\text{M}$ ) 存在下においても、本相乗作用の完全な消失が認められた (図2)。このことより、本相乗作用には、血管内皮由来のNO/cGMP系シグナルが関与することが明らかとなった。

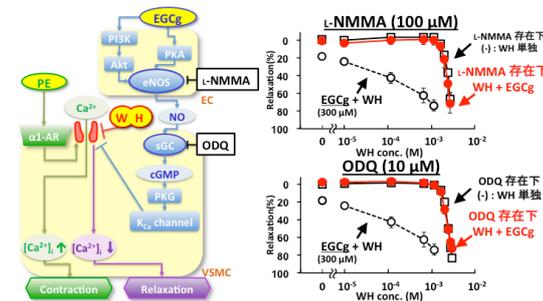


図2. NO/cGMP系阻害剤存在下におけるTrp-His(WH)/EGCgの併用効果

(2) 炎症血管における相乗的血管弛緩作用の発見

近年、老化及び炎症に伴い、薬剤等の血管弛緩作用が減弱するとの報告がなされている。このことは、食品成分においても、血管の老化あるいは炎症状態が、その血管機能改善作用に影響する可能性を示していると考えられる。そこで、これまでに明らかとしたTrp-HisとEGCgとの当該相乗的血管弛緩作用を、炎症血管において評価した。さらに、炎症血管でのさらなる相乗効果を発現する食品成分混合系の探索を試みた。まず、炎症誘導性サイトカインであるTNF- $\alpha$ を用いて誘導した炎症血管において、Trp-HisとEGCgとの血管弛緩作用を評価したところ、正常血管において認められた相乗的血管弛緩作用は、炎症血管において明らかに減弱することが明らかとなった (図3)。

そこで、穀物類に多く存在し、抗炎症作用が報告されている天然フェノール酸であるフェルラ酸を用いて、減弱した弛緩作用に対する影響を評価した。フェルラ酸を更なる併用成分として添加し、Trp-His と EGCg の混合溶液の弛緩作用を評価したところ、フェルラ酸添加において、TNF- $\alpha$  により減弱した弛緩作用の回復が認められた (図 3)。

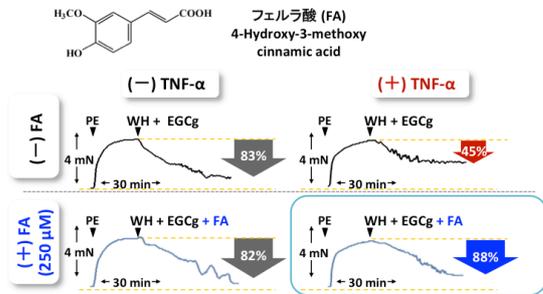


図3. TNF- $\alpha$ 誘導炎症血管におけるTrp-His(WH)/EGCgの血管弛緩作用におけるフェルラ酸の併用効果

そこで、当該回復作用に起因する食品成分混合系を明らかとするために、Trp-His 及び EGCg のそれぞれの弛緩作用に対するフェルラ酸の作用を評価したところ、フェルラ酸は、炎症血管においてのみ EGCg の血管弛緩作用を有意に増強することが明らかとなった。また、当該作用は、内皮除去血管において完全に消失した。さらに、血管からの NO 産生量を測定したところ、フェルラ酸は炎症血管においてのみ EGCg の NO 産生を増強することが明らかとなった (図 4)。このことから、炎症血管におけるフェルラ酸の増強効果には、NO 産生系シグナルが関与していることが明らかとなった。

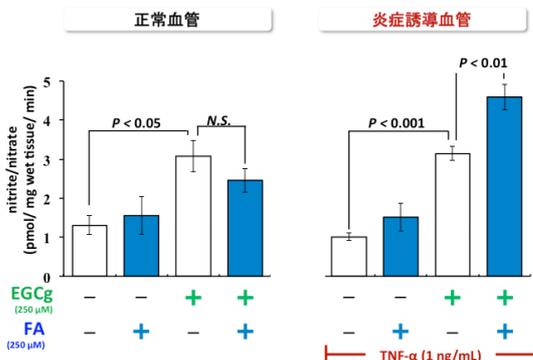


図4. 血管組織におけるフェルラ酸(FA)/EGCgのNO産生促進作用

### (3) 血管内皮細胞におけるフェルラ酸の炎症応答性血管機能改善作用のメカニズム解明

炎症血管において認められたフェルラ酸の血管弛緩作用の回復作用のメカニズムの解明を行った。

まず、フェルラ酸とエピガロカテキンガレートとの相乗的弛緩作用は、内皮除去血管において完全に消失したことから、フェルラ酸が血管内皮における炎症シグナルに作用していると考えられた。そこで、血管内皮細胞

(ヒト臍帯静脈内皮細胞 : HUVEC) を用いて、TNF- $\alpha$  刺激に対する NO 産生量を評価したところ、アセチルコリン (NO 産生誘導剤) による NO 産生量は、TNF- $\alpha$  により明らかに減弱した。そこで、HUVEC に対してフェルラ酸を同時に添加したところ、その NO 産生量の減弱が回復した (図 5)。このことから、フェルラ酸の添加が血管内皮における炎症シグナルに対して抑制的に作用することで、内皮由来の NO 産生量を増強することが明らかとなった。

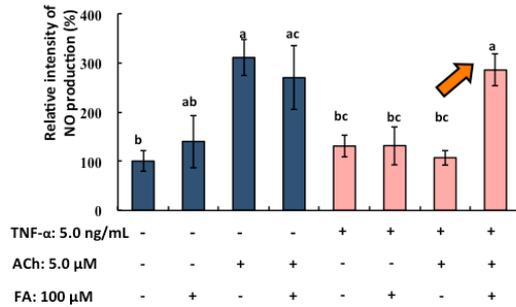


図5. HUVECsにおけるACh/FAのNO産生促進作用

さらに、TNF- $\alpha$  等の炎症シグナルにより誘導されるスーパーオキシドアニオンラジカル ( $\cdot\text{O}_2^-$ ) 産生量を評価したところ、フェルラ酸添加による影響は認められなかった。また、炎症状態においてその発現が誘導される iNOS に対する影響を評価したところ、iNOS 阻害剤による影響は認められなかった。一方、eNOS 阻害剤である L-NMMA を添加したところ、フェルラ酸による NO 産生能の回復は完全に消失した (図 6)。しかしながら、eNOS のリン酸化に対するフェルラ酸添加の影響は認められなかった。

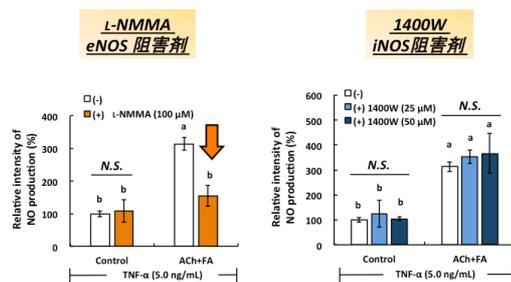


図6. 炎症誘導HUVECsにおけるFAのNO産生回復作用におけるeNOS及びiNOSの影響

そこで、NO 産生における律速酵素の一つとして、NO 基質であるアルギニンの再合成を仲介する酵素であるアルギニノコハク酸合成酵素 (ASS) に対する影響を評価したところ、TNF- $\alpha$  によりその発現量が減弱した ASS は、フェルラ酸により回復することが明らかとなった (図 7)。また、mRNA レベルにおいてもその発現量の回復が認められたことから、本作用は mRNA の転写レベルでの作用であることが明らかとなった。

さらに、TNF- $\alpha$ により誘導される主な転写因子として知られるNF- $\kappa$ Bに対する影響を評価したところ、TNF- $\alpha$ によるNF- $\kappa$ Bの核内移行は、フェルラ酸の添加により明らかに抑制された。このことから、フェルラ酸はTNF- $\alpha$ により誘導される炎症シグナルの一つであるNF- $\kappa$ B系シグナルの抑制を介したASSの発現回復により、炎症状態の血管機能を回復させることが明らかとなった。

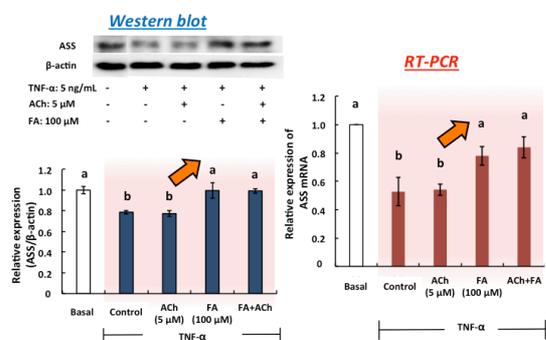


図7. 炎症誘導HUVECsにおけるASS発現に対するFAの添加効果

以上の結果より、食品成分に相乗的血管弛緩作用が明らかとなり、EGCgとTrp-Hisの相乗効果には、NO産生系シグナルが重要であることが示された。さらに、炎症状態の血管においては、食品成分の弛緩作用が減弱することが示され、さらなる食品成分（フェルラ酸）の併用により、炎症血管において低下した機能を回復可能であることが示された。さらに、本研究を基盤とし、さらなる相乗効果や、炎症状態を回復可能な食品成分混合系の解明が期待される。

## 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 2 件)

- ① Zhao J, Suyama A, Tanaka M, Matsui T., Ferulic acid enhances the vasorelaxant effect of epigallocatechin gallate in tumor necrosis factor-alpha-induced inflammatory rat aorta., *J. Nutr. Biochem.*, 査読有, 25, 2014 807-814  
doi: 10.1016/j.jnutbio.2014.03.013
- ② Tanaka M, Zhao J, Suyama A, Matsui T., Epigallocatechin gallate promotes the vasorelaxation power of the antiatherosclerotic dipeptide Trp-His in contracted rat aorta, *J. Agric. Food Chem.*, 査読有, 60, 2012 :9048-54  
doi: 10.1021/jf3010228

[学会発表] (計 6 件)

- ① Mitsuru Tanaka, Jian Zhao, Aki Suyama, Toshiro Matsui, Ferulic acid improves acetylcholine-induced nitric oxide production via up-regulation of

argininosuccinate synthase in TNF-alpha-stimulated inflammatory human umbilical vein endothelial cells., *12th Asian Congress of Nutrition (12th ACN)*, 2015年5月15日, パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市)

- ② 須山 晶, Jian Zhao, 田中 充, 松井利郎, TNF- $\alpha$ 誘導性血管における食品成分の血管弛緩作用の解明, 日本栄養・食糧学会九州・沖縄支部および日本食品科学工学会西日本支部合同大会, 2013年10月19日, 九州大学 (福岡県・福岡市)
- ③ Jian Zhao, Aki Suyama, Mitsuru Tanaka, Toshiro Matsui, Ferulic acid enhances vasorelaxation effect of epigallocatechin gallate in tumor necrosis factor-alpha-induced inflammatory rat aorta., 日本食品科学工学会 第60回記念大会, 2013年8月30日, 実践女子大学 (東京都)
- ④ Jian Zhao, Aki Suyama, Mitsuru Tanaka, Toshiro Matsui, Synergistic Enhancement of Anti-atherosclerotic Dipeptide Trp-His-induced Vasorelaxation by Bioactive Compounds in Rat Thoracic Aorta, 平成24年度 日本食品科学工学会西日本支部大会, 2012年12月8日, 九州大学 (福岡県・福岡市)
- ⑤ Mitsuru Tanaka, Aki Suyama, Jian Zhao, Toshiro Matsui, EPIGALLOCATECHIN GALLATE ENHANCES THE ENDOTHELIUM-INDEPENDENT VASORELAXATION OF THE ANTI-ATHEROSCLEROTIC  $Ca^{2+}$  CHANNEL BLOCKING PEPTIDE TRP-HIS IN THORACIC AORTA FROM SPRAGUE-DAWLEY RATS, *24th Meeting of the International Society of Hypertension*, 2012年10月3日, Sydney (Australia)
- ⑥ 田中 充, 須山 晶, 趙 健, 松井 利郎, 低分子ペプチド Trp-His と EGCg との相乗的血管弛緩作用は NO/cGMP 系賦活化を介して発現する, 第66回日本栄養・食糧学会大会, 2012年5月19日, 東北大学 (宮城県・仙台市)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

## 6. 研究組織

(1)研究代表者

田中 充 (TANAKA Mitsuru)

研究者番号：70584209