

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 8 月 4 日現在

機関番号：32669

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24780258

研究課題名(和文) コラーゲン加水分解物の経口摂取がヒトと病態モデル動物の血管前駆細胞に及ぼす作用

研究課題名(英文) Effect of collagen hydrolysate on endothelial cells in human and spontaneously hypertensive rats

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)：鶏コラーゲン加水分解物(CCH)の摂取は、血圧が高い被験者の血管内皮前駆細胞(EPC)を活性化する。今回、EPCの活性化をin vitroで再現し、作用機序を明らかにすること、高血圧以外の生活習慣病に関わるモデルでも同様の効果が認められるのか、について検討した。昇圧ホルモンで処理したEPCの増殖能は、CCH摂取後の血漿の添加によりCCH未摂取の場合の1/3まで回復した。更に、脳卒中や肥満モデルラットに対してCCHを投与したところ、昇圧ホルモン前駆体の生成を抑制し、血管の恒常性に関わるタンパク質量を有意に増加させた。これらの結果から、CCHの摂取は血管の恒常性維持に寄与していると推察された。

研究成果の概要(英文)：In our previous studies, administration of the chicken collagen hydrolysate (CCH) activates endothelial progenitor cells (EPC) which are collected from mildly hypertensive human subjects. The purpose of our current study was twofold: first, to clarify the mechanism of EPC proliferative activity of chicken collagen hydrolysate in vitro; and second, to observe whether we could obtain the same results as above using different pathological animal model. Colony forming activity of angiotensin II treated EPCs were recovered to one third by addition of serum which was ingested CCH in growth medium compared with that of non-consumption. Furthermore, administration of CCH on stroke- or obese-model rats suppressed the precursor of vasoconstrictor hormone, and increased expression of the enzyme which contribute the compliance of blood vessels. It was therefore concluded that ingestion of CCH had contributed to constant maintenance of a blood vessel.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学・畜産学・草地学

キーワード：血管内皮前駆細胞 高血圧自然発症ラット 鶏コラーゲン加水分解物

## 1. 研究開始当初の背景

国民の 1/6 が罹患していると思われていた生活習慣病は、血管の機能不全から心筋梗塞や脳卒中など死に直結する疾患を引き起こす。死因別死亡割合でも、循環器系疾患による死亡はガンに次いで多く、国民の健康を考える上で血管機能の改善は緊急かつ重要な課題と位置付けられる。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おり、生体が健全な状態であるためには、血管が正常に機能する必要がある。

これまでに我々は、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循環器疾患の改善を目的として、東洋では薬膳として、欧米でも伝承療法として使われている。つまり、鶏エキスの摂取には、循環器機能を改善する薬理作用が期待される。その中で、鶏エキスに含まれるコラーゲンの加水分解物を 4 週間摂取すると、正常高値や軽症高血圧の被験者の血圧を平均で 20mmHg 有意に血圧を低下させ、さらに、被験者から得られた血管内皮前駆細胞(EPC)を活性化させることを明らかにしてきた。

## 2. 研究の目的

そこで本研究では、この鶏コラーゲン加水分解物(CCH)の経口摂取がヒトならびに病態モデル動物の EPC に及ぼす作用の解明を目的とした。また、CCH が高血圧だけではなく、他の生活習慣病に対しても効果を示すのか確認するため、脳卒中モデルラットと肥満モデルラットを用いて、CCH の摂取による循環器系への影響を検討した。

## 3. 研究の方法

### (1) CCH の摂取がヒト由来 EPC の増殖活性に与える影響

健康な人から提供された全血から単核球画分を分画し、さらに CD34+, CD45-抗体ビーズを用いて、EPC を調製した。100ng/ml のアンジオテンシン II(AngII)を培地に添加し、30 分間処理することで、EPC に刺激を与えた。また、CCH を摂取後 2 時間目の血液から血清を調製し、メチルセルロース培地に終濃度で 1%となるように添加することで、AngII 処理した EPC のコロニー形成能(増殖能)を評価した。

### (2) CCH の摂取が脳卒中や肥満病態をもつ高血圧ラットに与える影響

#### ①供試動物

7 週齢の雄性正常血圧ラット (WKY)、高血圧自然発症ラット (SHR)、脳卒中易発症高血圧自然発症ラット (SHRSP)、肥満高血圧ラット (SHR/NDmer-cp) を用い、各群に CCH(1g/kg)を 7 週間投与した群(n=6)と投与しない群(n=6)に分けた。、血圧測定には

tail-cuff 法を採用し、非観血血圧装置 BP-98A(Softron)を使用した。試験期間終了後に、大静脈血と各組織を採取した。

### ②Real-time PCR を用いた遺伝子発現量の確認

レニン、アンジオテンシノーゲン (AGN)、アンジオテンシン I 変換酵素 (ACE) はそれぞれ、腎臓、肝臓および肺から抽出した mRNA を使用した。また、内皮型一酸化窒素合成酵素 (eNOS) は脳および血管から抽出した mRNA を用いた。

### ③ウェスタンブロット法を用いたタンパク質発現量の確認

各組織を一部採取し、組織の 10 倍量の Lysis buffer を加え、ホモジネート後、Laemmli サンプルバッファーを加えて、電気泳動を行った。PVDF 膜へ転写したタンパク質は eNOS 抗体、p-eNOS 抗体 (Ser1177)、AGN 抗体、 $\beta$ -アクトチン抗体を 1 次抗体として、化学発光法で検出した。

### ③統計解析

全データは、平均値±標準偏差で示した。有意差検定には Student-t 検定を用い、\*,  $p<0.05$ , \*\*,  $p<0.01$  で有意差ありと判定した。

## 4. 研究成果

### (1) CCH の摂取がヒト由来 EPC の増殖活性に与える影響

健康なヒトから調製した EPC に血管を障害させるホルモンの一つである AngII で処理した場合と、AngII 処理の後に CCH 摂取後 2 時間後の血清を添加した場合の結果を図 1 に示した。

AngII 処理により未処理のものに比べ、1/5 までコロニー形成能が低下したが、CCH 摂取後の血清を加えることで、約 1.6 倍に有意な増加が認められた。従って、血圧が高い被験者で認められた EPC の活性化は、直接的に CCH の摂取によることが確認された。

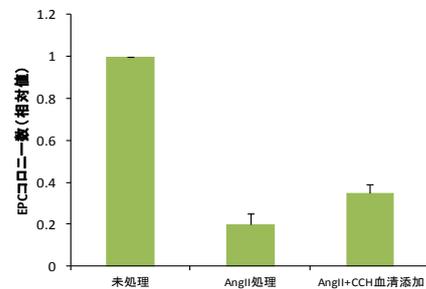


図 1. CCH 摂取後の血清添加による EPC の増殖能の比較

### (2) CCH の摂取が脳卒中や肥満病態をもつ病態ラットに与える影響

各ラットで 7 週間の CCH の投与の有無による体重の差に違いは認められなかった。次に、図 2 に各ラットに CCH を投与した時の血圧の変動を示した。SHR では CCH の摂取による血圧低下が認められたが、SHRSP お

よび SHR/NDmcr-cp では血圧の変動は認められなかった。

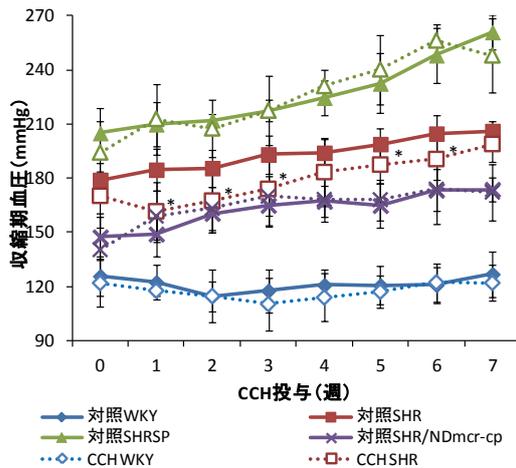


図2. CCHの摂取による病態モデルラットの血圧変化  
続いて、CCHの摂取が肝臓のAGT mRNAの発現量に与える影響について、調べた。図3に示すように、CCHの摂取により昇圧因子であるAngIIの前駆体タンパク質の遺伝子発現量が正常ラットであるWKYを除いて有意に低下した。

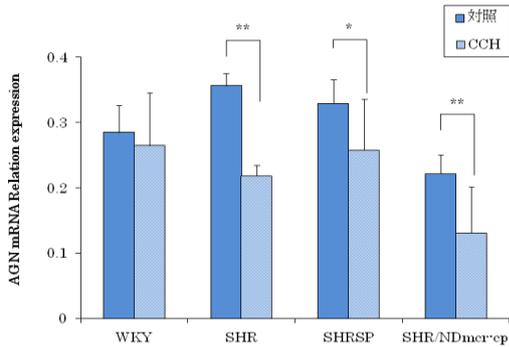


図3. CCHの摂取による肝臓AGT mRNA発現量に及ぼす影響

一方、タンパク質レベルで比較すると、図4に示すように、SHRとSHR/NDmcr-cpでは低下するものの、SHRSPでは上昇する結果となった。これまで、CCHによるSHRの血圧低下作用はAngIIの阻害活性によるものが明らかにされてきたが、今回、AGTにも作用することが明らかとなった。

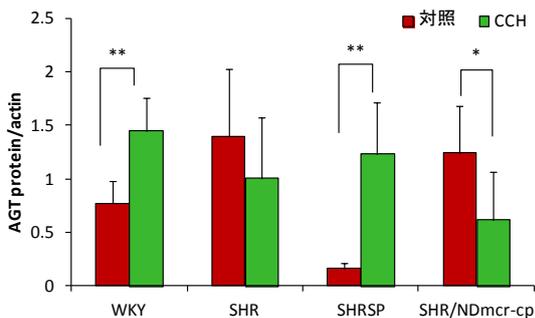


図4. CCHの摂取がAGTタンパク質発現量に及ぼす影響

さらに、血管の恒常性に影響を与える因子として、リン酸化eNOS量を測ったところ、図5に示すように、SHRとSHRSPで有意な増加が認められた。

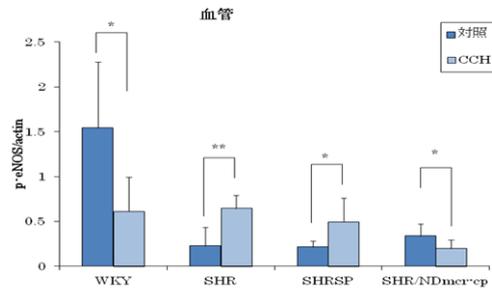


図5. CCHの摂取が血管のp-eNOSタンパク質発現量に及ぼす影響

この理由として、ELISA法により血漿中のVEGF量を測定したところ、全てのラットにおいて、CCHの摂取によりVEGF量が増加していた(図6)。

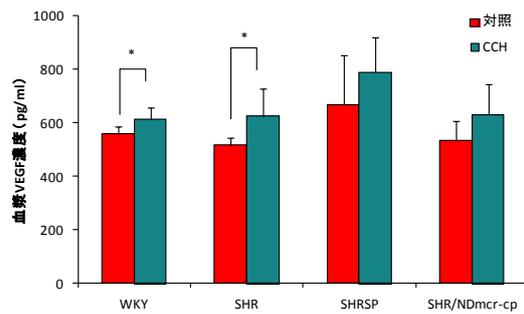


図6. CCHの摂取が血漿中のVEGF量に及ぼす影響

今回、各病態ラットから調製したEPCのコロニー形成能については、再現性のあるデータ取得できなかったが、VEGFの適度な増加はEPCの増殖を活性化することが知られており、また血管の恒常性に関わるリン酸化eNOSも増加したことから、CCHの摂取は血管の恒常性に一定の効果があると考えられた。

## 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)

[雑誌論文] (計 0 件)

[学会発表] (計 1 件)

國分由希、江草(雑賀)愛、小熊敦之、西村敏英、起源の異なるタンパク質加水分解物の投与が高血圧自然発症ラットの循環器系へ与える影響、第66回日本栄養・食糧学会学講演要旨集 pp. 215

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等  
該当なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

江草 愛 (EGUSA, Ai )

研究者番号：90521972

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：