

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 16 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25292077

研究課題名(和文) 機能性食品成分による新規血栓制御メカニズムの解明と食品の機能性評価への応用

研究課題名(英文) Elucidation of the anti-thrombotic property of food component and its application for the development of functional food.

研究代表者

関 泰一郎 (SEKI, Taiichiro)

日本大学・生物資源科学部・教授

研究者番号：20187834

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：わが国では、がんと並んで心筋梗塞や脳血管疾患などの血栓・塞栓性疾患が主要な死亡原因である。血液凝固第Ⅲ因子(組織因子;TF)は、動脈硬化巣に高発現し、血栓性疾患を惹起する。本研究では組織因子の活性調節機構に着目し、新しい血栓制御メカニズムの解明と食品機能性の開発への応用を試みた。TF活性測定法を確立し、ガーリックやシナモンの成分がTF活性を阻害することを明らかにした。さらにこれらの成分による血管内皮細胞のTF発現の抑制とそのメカニズム、抗血栓作用について解明し、TFが生活習慣病予防のための新しいターゲットになることを明らかにした。今後、TFに作用する食品成分の利用・応用が期待される。

研究成果の概要(英文)：Thrombotic diseases including myocardial infarction and cerebrovascular diseases are the major causes of death. Blood coagulation factor III (tissue factor) is highly expressed on the arteriosclerotic region and triggering thrombotic diseases. In this study, we characterized the tissue factor as molecular target of food factors as well as elucidating novel regulatory mechanism(s) of hemostasis to develop the food function. We demonstrated the anti-thrombotic property of garlic derived component diallyl trisulfide (DATS) at molecular basis. DATS inhibits thrombus formation through the inhibition of tissue factor gene expression in endothelial cells and of its activity by inhibiting allosteric disulfide bond (ADB) formation. ADB in the tissue factor molecule would be a promising molecular target in the development of functional food preventing thrombotic diseases.

研究分野：栄養生理化学

キーワード：食品機能

1. 研究開始当初の背景

我が国において心筋梗塞や脳梗塞などの血栓性の疾患は、心疾患や脳血管疾患の主な死亡原因であり、日本人の死因の約 25%を占めている(平成 26 年 厚生労働省人口動態統計)。これは日本人の死因第一位のがんによる死亡者数にほぼ匹敵し、予防法の確立が重要課題となっている。血液は生体の恒常性の維持に極めて重要な役割を担っており、血管損傷時には血液の損失を防止するために直ちに凝固し、止血する。止血は、血管損傷部位への血小板の粘着・凝集による一次止血、フィブリン網の形成による二次止血からなり、両者の協調による強固な血栓の形成により完了する。損傷部位の修復に伴い、通常血栓は線溶系により生理的に分解・除去される。凝固と線溶のバランスは厳密に維持され、それにより血管内での血液の流動性が保障されている。しかし、このバランスが破綻し、凝固傾向となると過剰な血栓が容易に形成され、血栓性疾患を発症しやすくなる(易血栓性)。血液凝固系によるフィブリン形成には内因系凝固と外因系凝固の二つの経路が存在する。外因系凝固の惹起因子 Tissue Factor(以下 TF;血液凝固第 因子)は脳、肺、胎盤などにおいて、循環血と直接接しない血管外膜などに発現している。一方、正常な血管内皮細胞では、炎症性サイトカイン等の刺激により TF の発現が誘導される。動脈硬化巣には多量の TF が発現しており、TF は動脈硬化を基盤とした血栓形成の惹起に重要な役割を果たしている。したがって、TF は血栓性疾患の予防を考える上で重要な分子標的の一つであると考えられる。

食品には、栄養機能(一次機能)、嗜好性(二次機能)に加え、生理機能(三次機能)が備わっている。ガーリック(*Allium sativum* L.)は、古来より食用に供されてきた。歴史的には民間薬としても用いられており、これまでに抗血栓作用、抗がん作用、抗炎症作用などの様々な生理作用を示すことが報告され、顕著な食品機能性を示すことが注目されている。ガーリックは植物組織の損傷により、酵素反応と非酵素的な反応の両者により有機硫黄化合物を生成する。ガーリックの生理作用の多くは、これらの有機硫黄化合物によることが報告されている。われわれはこれまでにガーリック由来香気成分であるアリルスルフィド類が血小板機能を抑制し、血栓形成を阻害する可能性を明らかにしてきた。一方、血小板機能と協調して血栓形成に重要な役割を果たすフィブリン形成(二次止血)にアリルスルフィド類をはじめとした食品成分が及ぼす影響については、ほとんど研究されていない。

2. 研究の目的

本研究では、食品成分による生活習慣病の予防、改善の標的を、細胞・分子レベルで、新しい切り口から解明し、生活習慣病の基盤

病態(脂肪組織の慢性炎症)、終末病態(動脈硬化を基盤とした血栓性疾患)を制御する新たな食品機能を開発する。また allosteric disulfide bond に着目し、新しい血栓制御メカニズムの解明と食品の機能性評価への応用など、食品科学の発展、国民の健康増進につながる様々な知見を提供することを目的とする。

本研究では、ガーリックやシナモンなどいくつかの香辛料の成分に着目し、食品成分が外因系血液凝固惹起因子 TF の発現と活性に及ぼす影響とその作用メカニズムについて、分子・細胞レベルで検討し、食品成分の抗血栓作用とそのメカニズムの詳細を明らかにしようとした。

3. 研究の方法

(1) 食品成分が生活習慣病の基盤病態に及ぼす影響

食品成分が炎症反応に及ぼす影響についてマウスマクロファージ RAW264.7 細胞を用いて検討した。LPS で刺激した RAW264.7 の NF κ B の活性化、一酸化窒素産生、サイトカイン誘導能について、グリース法、qPCR 法を用いて検討した。また、食品成分の抗肥満作用についても高脂肪食を負荷した C57BL/6J マウスを用いて検討した。

(2) 組織因子(TF)活性測定法の確立と食品成分が TF の活性化に及ぼす影響

TF は 47 kDa の膜貫通型タンパク質であり、血液中で第 因子と複合体を形成して活性化され、下流の第 因子を活性化することで外因系凝固反応を惹起する。通常、不活性型として細胞表面に存在し、特定の環境やサイトカインの刺激により活性型 TF となる。TF の活性化メカニズムには諸説あるが、Cys¹⁸⁶ と Cys²⁰⁹ のアロステリックジスルフィド結合の形成が重要であることが報告されている。本研究では、ガーリック由来のジアリルスルフィド(DATS)をはじめとした食品成分が TF の活性化に及ぼす影響を検討するためにヒト急性前骨髄球性白血病細胞 HL60 を用いた測定系を確立した。HL60 細胞に phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) を添加培養して TF 発現を誘導後、HgCl₂ を酸化剤として用い、ジスルフィド結合を形成させて TF を活性化した。この活性化 TF に DATS などの被検試料存在下、非存在下で血漿を添加し、フィブリンクロット形成時間を指標として外因系凝固に及ぼす影響を評価した。また、recombinant TF を用いて Cys¹⁸⁶ と Cys²⁰⁹ の修飾、ジスルフィド結合の形成に及ぼす影響についても検討した。

(3) 食品成分が TF の発現に及ぼす影響

DATS をはじめとした食品成分が血管内皮細胞において炎症性サイトカイン誘導性の TF 発現に及ぼす影響を明らかにするため、継代回数 3-10 の human umbilical vein endothelial

cells (HUVEC) をモデルとして用いた。はじめに被検試料の HUVEC に対する毒性を評価するために、20% FBS 含有 M199 培地でコンフルエントになるまで HUVEC を培養後、終濃度 100 μM までの各種濃度の試料を添加した 2% FBS 含有 M199 培地に交換して 16 時間培養した。その後、培養上清中の lactate dehydrogenase (LDH) 活性を測定した。また、食品成分が血管内皮細胞の TF mRNA 発現と TF タンパク質発現に及ぼす影響を検討する目的で試料を 30 分間前処理した HUVEC に tumor necrosis factor- α (TNF- α) で TF 発現を誘導後、TF mRNA 発現と TF タンパク質の発現をリアルタイム PCR 法とウエスタンブロットティング法を用いて解析した。

(4) DATS をはじめとした食品成分の抗血栓作用の解析

C57BL/6J オスマウス (6 週齢、20-25 g) に標準固型飼料を給餌し、2 週間予備飼育した。本試験では、コーンオイルに溶解した DATS, methyl allyl trisulfide (MATs) (200 $\mu\text{mol/kg}$ b.w./day) を 5 日間連続で経口投与した。control 群にはコーン油のみを投与し、最終投与の翌日、細胞動態を可視化するために FITC-dextran と、レーザー照射により活性酸素種 (ROS) 産生させるために hemato-porphyrin を投与した。488 nm のレーザーを照射することにより ROS を産生させ、血栓形成を誘導して共焦点レーザー顕微鏡を用いて血栓形成過程を観察した。データはレーザー照射 100 秒後の血管面積に対する血栓面積の比率で示した。

4. 研究成果

(1) 食品成分が生活習慣病の基盤病態に及ぼす影響

いくつかの食品成分がマクロファージの活性化ならびに炎症関連因子の発現に及ぼす影響について検討を行った。その結果、ガーリック由来のジアリルトリスルフィドは、LPS 誘導性の NF- κ B の活性化を抑制し、一酸化窒素の産生、サイトカインの発現誘導を抑制した。また、ガーリックの精油成分であるガーリックオイルは、エネルギー代謝を亢進させ、高脂肪食誘導肥満マウスの肥満を抑制した。

(2) TF 活性測定法の確立と食品成分が TF の活性化に及ぼす影響

HL60 細胞と HgCl_2 を用いて、TF 活性の測定系を確立した。PMA により TF 発現を誘導した HL60 細胞に HgCl_2 を処理することでクロット形成時間は TF 発現を誘導していない細胞と比較して有意に短縮した。また、DATS は HgCl_2 により活性化された TF によるクロット形成時間を濃度依存的に延長した。これらの結果から、DATS はジスルフィド結合の形成による TF の活性化を抑制することが明らかになった (図 1)。また、硫黄の原子数

の異なるアリルスルフィドについても検討したところ diallyl monosulfide (DAS), diallyl disulfide (DADS) はクロット形成時間にほとんど影響を及ぼさなかった (結果は示さず)。

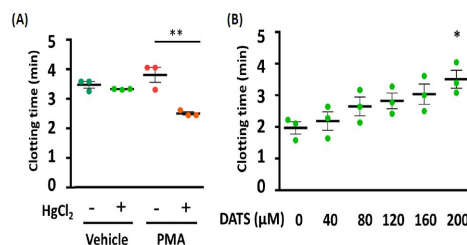


図 1. アリルスルフィドが TF 活性に及ぼす影響. (A) PMA により TF 発現を誘導した HL60 を塩化水銀で処理すると凝固時間は有意に短縮した。(B) DATS は TF 活性を濃度依存的に阻害し、凝固時間を延長した。

(3) 食品成分が TF の発現に及ぼす影響

DATS, シナモン由来シナナムアルデヒド (CA) 添加後の培養上清中の LDH 活性は 100 μM まではコントロールと差はなく、これらの化合物は HUVEC に対して毒性を示さないことが明らかとなった。また、HUVEC に TNF- α を添加培養すると、TF mRNA 発現は TNF- α 添加後 2 時間で最大となり、無刺激時 (0 時間) の約 40 倍に増加した。この TF mRNA 発現は 100 μM DATS の添加培養により、16%にまで減少した (図 2)。

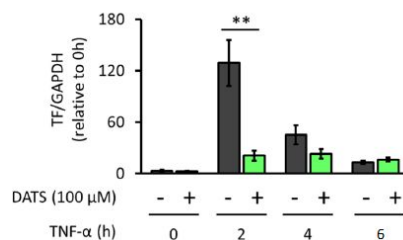


図 2. DATS が培養血管内皮細胞の TNF- α 誘導性 TF 遺伝子発現に及ぼす影響

TF タンパク質は TNF- α 添加後 2 時間から発現が上昇して 4 時間で最大となり、0 時間と比較して約 2 倍に増加した。TNF- α 添加後 4 時間での TF タンパク質発現は DATS の前処理により濃度依存的に抑制され、100 μM DATS 添加細胞では 30%にまで減少した。さらに DATS による TNF- α 誘導性の TF 発現抑制メカニズムを明らかにしようとした。TNF- α による TF の発現シグナルを伝達する MAPK 経路の JNK のリン酸化に及ぼす DATS の影響を、ウエスタンブロットティング法を用いて検討した。その結果、JNK のリン酸化は TNF- α 添加後 15 分で最大となったが、

DATSの前処理によりTNF- α によるJNKのリン酸化は抑制された。

(4) DATSをはじめとした食品成分の抗血栓作用の解析

*In vivo*でのDATSをはじめとした食品成分の抗血栓作用を検討した。C57BL/6JマウスにDATSもしくはMATS (200 μ mol/kg, b.w./day) 5日間連続経口投与し、ROS誘導性血栓形成にDATS及びMATSが及ぼす影響について分子イメージ手法を用いて検討した。その結果、control, DATS, MATSすべての群で血栓を形成したが、DATS群はcontrol群と比較して血管面積に対する血栓面積は小さく、MATS群ではDATS群よりもその比率がさらに小さかった。DATS及びMATSは共に血栓形成を遅延し、その作用はMATSの方が強い可能性が明らかとなった。

本研究では食品成分の抗血栓作用について明らかにした。特に血小板凝集抑制作用が明らかとなっているガーリック由来の香り成分DATSがフィブリン形成を惹起するTFの活性と発現に及ぼす影響について先ず検討した。その結果、DATSはTFの活性化を抑制した。DATSは大腸がん細胞の細胞骨格タンパク質 β -チューブリンの特定のシステイン残基をS-allyl修飾することが報告されている。したがってDATSはTFの活性化に関与するシステイン残基を修飾し、アロステリックジスルフィド結合の形成を阻害する可能性が考えられる。また、DATSはMAPK経路のJNKのリン酸化を阻害してTNF- α 誘導性のTF発現を抑制した。DATSは血小板機能の抑制作用に加えて、外因系凝固を抑制することがはじめて明らかになった。ガーリックの機能性食品としての利用・応用、DATSの創薬への応用が期待される。

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8件)

Seki T, Hosono T, Prevention of cardiovascular diseases by garlic-derived sulfur compounds. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)*. 2015, 61, S83-S85. 査読有

doi: 10.3177/jnsv.61.S83.

関 泰一郎, 細野 崇, 血液の凝固・線溶とメタボリックシンドローム、生活習慣病、*化学と生物*, 53(6), 374-380, 2015. 査読有

doi.org/10.1271/kagakutoseibutsu.53.374

Watanabe K, Hosono T, Watanabe K, Hosono-Fukao T, Ariga T, Seki T. Diallyl trisulfide induces apoptosis in Jurkat cells by the modification of cysteine residues in thioredoxin. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2014; 78(8): 1418-1420. 査読有

doi: 10.1080/09168451.2014.921564.

Suda S, Watanabe K, Tanaka Y, Watanabe K, Tanaka R, Ogihara J, Ariga T, Hosono-Fukao T, Hosono T, Seki T. Identification of molecular target of diallyl trisulfide in leukemic cells. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2014; 78(8): 1415-1417. 査読有

doi: 10.1080/09168451.2014.921563.

Terada Y, Hosono T, Seki T, Ariga T, Ito S, Narukawa M, Watanabe T. Sulphur-containing compounds of durian activate the thermogenesis-inducing receptors TRPA1 and TRPV1. *Food Chem*. 2014;157:213- 220. 査読有

doi:10.1016/j.foodchem.2014.02.031.

Yamaguchi M, Takai S, Hosono A, Seki T. Bovine milk-derived α -lactalbumin inhibits colon inflammation and carcinogenesis in azoxymethane and dextran sodium sulfate-treated mice. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2014; 78(4): 672-679. 査読有

doi: 10.1080/09168451.2014.890034.

Shen Y, Honma N, Kobayashi K, Jia LN, Hosono T, Shindo K, Ariga T, Seki T. Cinnamon Extract Enhances Glucose Uptake in 3T3-L1 Adipocytes and C2C12 Myocytes by Inducing LKB1-AMP-Activated Protein Kinase Signaling. *PLoS One*. 2014; 9(2): e87894. 査読有

doi:10.1371/journal.pone.0087894.

eCollection 2014.

三浦 徳、細野 崇、関 泰一郎、TAFIの構造と機能、*日本血栓止血学会誌*, 25(4), 512-515, 2014. 査読有

[学会発表](計13件)

岡本 篤、小島貴之、細野 崇、関 泰一郎 ガーリックオイルの肥満改善効果とそのメカニズムの解明、第70回日本栄養・食糧学会大会、武庫川女子大(兵庫県・西宮市) 2016年5月15日

奥江 紗知子、今井孝俊、日吉滉平、船戸里香、中口夏美、林 浩和、横山令奈、細野 崇、関 泰一郎、ガーリック由来有機硫黄化合物の抗炎症作用とその作用メカニズムに関する研究、第70回日本栄養・食糧学会大会、武庫川女子大(兵庫県・西宮市) 2016年5月14日

矢口真実、荒木彩花、奥江 紗知子、細野 崇、関 泰一郎、ガーリック由来香り成分が外因系凝固に及ぼす影響、日本農芸化学会2016年度大会、札幌コンベンションセンター(北海道・札幌市)2016年3月28日

Seki T, Kagawa Y, Hosono T, Watanabe T, Amelioration of obesity by garlic oil and its relating allyl sulfur compounds.

The 6th International Conference on Food Factors (ICoFF2015), 2015/11/23, Seoul (South Korea). Invited Speaker

Yaguchi M, Sato A, Araki S, Okue S, Hosono T, Nishimura S, Seki T, Diallyl trisulfide inhibits thrombus formation through the inhibition of both platelet aggregation and extrinsic coagulation pathway. The 6th International Conference on Food Factors (ICoFF2015), 2015/11/23, Seoul (South Korea).

矢口真実、細野 崇、関 泰一郎、ガーリック由来スルフィドの抗血栓作用とそのメカニズムの解明、第 37 回日本血栓止血学会学術集会、甲府市総合市民会館（甲府市・山梨県）2015 年 5 月 23 日

Yaguchi M, Sato A, Hosono T, Nishimura S, Seki T, The effect of flavor compounds derived from garlic on thrombus formation. 12th Asian Congress of Nutrition (ACN2015), 2015/05/16, Pacifico Yokohama (神奈川県・横浜市).

Seki T, Hosono T, Asian herbal and medicinal food for the prevention of life style-related diseases: In symposium; Asian Herbal and Medicinal Food for the Prevention of Lifestyle-related Diseases. 12th Asian Congress of Nutrition (ACN2015), 2015/05/15, Pacifico Yokohama (神奈川県・横浜市). Invited Speaker

矢口真実、細野 崇、関 泰一郎、ガーリック由来香気成分の抗血栓作用の解明、日本農芸化学会 2015 年度大会、岡山大学（岡山県・岡山市）2015 年 3 月 28 日

Seki T, Herbal and dietary phytochemicals and the prevention of life-style related diseases. 17th International Congress of Oriental Medicine. 2014/11/3, Taipei (Taiwan). Invited Speaker

Seki T, Kagawa Y, Hosono T, Ariga T, Watanabe T, Anti-obesity effect of garlic oil. 2014 International Garlic Symposium; Role of Garlic in Cardiovascular Disease Prevention, Metabolic Syndrome and Immunology. 2014/03/05, California (USA).

Seki T, Food function of Garlic: from active principle to physiological relevance at molecular basis. 2013 International Symposium of Condiment Vegetables. 2013/11/12, Suncheon (South Korea). Invited Speaker

Seki T, Garlic-derived compounds for the prevention of lifestyle-related diseases. In Symposium: Phytochemicals responsible for the food function, from the chemistry to physiological relevance and human health. 20th International Congress of Nutrition (ICN 2013). 2013/09/20, Granada (Spain). Invited Speaker

〔図書〕(計 4 件)

Seki T, Hosono T, Kumagai H, Ariga T Functional Foods, Nutraceuticals and Natural Products-Concepts and applications

(Vattem D.A., Maitin V Edts) (Allium: Garlic and Onion, pp417-456) DEStech Publications, Inc. USA, 2016.

ISBN 978-1-60595-101-0

関 泰一郎、三浦 徳、新・血栓止血血管学：抗凝固と線溶（一瀬白帝、丸山征郎、和田英夫編著）（TAFI の基礎と臨床（pp106-113）全 133 ページ）金芳堂、2015 年。

関 泰一郎、細野 崇、食品因子による栄養機能制御（日本栄養・食糧学会監修）（第 6 章ネギ属植物の含硫成分の機能性（pp83-94）執筆、全 283 ページ）建帛社、2015 年。

関 泰一郎、食品の保健機能と生理学（西村敏英、浦野哲盟編集）（血糖値の上昇を抑制する機能（pp60-65）、血中の中性脂肪やコレステロールの上昇を抑制する機能（pp73-80）、貧血を予防する機能（pp86-88）、血栓を抑制する機能（pp102-104）執筆担当、全 208 ページ）アイ・ケイコーポレーション、2015 年

〔その他〕

ホームページ等

<http://hp.brs.nihon-u.ac.jp/~eiyo/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

関 泰一郎 (SEKI, Taiichiro)
日本大学・生物資源科学部・教授
研究者番号：20187834

(2) 研究分担者

細野 崇 (HOSONO, Takashi)
日本大学・生物資源科学部・講師
研究者番号：80445741

沈 燕 (SHEN, Yan)

日本大学・生物資源科学部・研究員
研究者番号：80614007

（平成 26 年度より研究協力者）

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

矢口 真実 (YAGUCHI, Manami)

奥江紗知子 (OKUE, Sachiko)

岡本 篤 (OKAMOTO, Atsushi)

佐藤明日香 (SATO, Asuka)

三浦 徳 (MIURA, Atsushi)

西村 智 (NISHIMURA, Satoshi)