

動脈硬化症を予防する食品機能成分の探索と作用機構に関する研究

塚本 佐知子

熊本大学大学院生命科学研究部（薬学系） 教授

緒言

日本でも、長寿社会の到来や生活習慣の欧米化により、動脈硬化、高脂血症、肥満などのメタボリックシンドローム（生活習慣病）が大きな社会問題になっている。特に、虚血性心疾患や脳血管障害等の血管病変を主体とする循環器疾患は、今後さらに増加することが予想され、その予防・治療薬の開発は社会的要請が極めて高い研究課題である。そこで、本研究では、粥状動脈硬化症（アテローム性動脈硬化症）を予防する食品機能成分に関する研究を行う。動脈硬化症の初期病変過程は図1に示すとおりである。

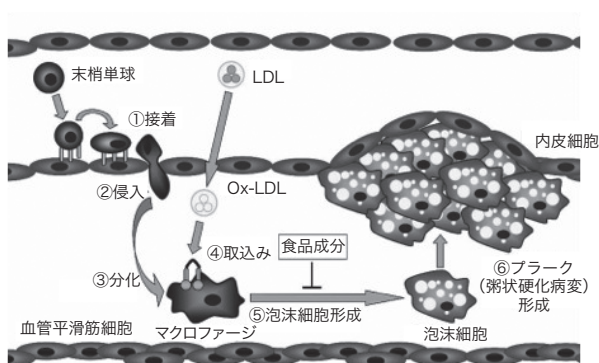


図1 動脈硬化症の初期病変過程

血管内腔に存在する末梢単球は、高コレステロール症、高血圧、喫煙、糖尿病および感染など種々の危険因子により内皮細胞が活性化されると、内皮細胞表面に接着する（図1の①）。さらに、末梢単球は内皮細胞間隙より内皮下に侵入して（②）、マクロファージへと分化する（③）。マクロファージは、変性したLDL（Ox-LDL等）を取込み（④）、泡沫細胞を形成し（⑤）、内部にコレステロールエステル（CE）を蓄積する。プラーク（粥状動脈硬化病変）の初期には泡沫細胞が主体であるが（⑥）、粥状動脈硬化症の進展にともない、本来は中膜に存在していた血管平滑筋細胞が遊走し、泡沫細胞を囲むように増殖する。やがて、プラークが破綻し血栓形成か

ら血管閉塞を生じ、心血管疾患の発症へとつながる。このように動脈硬化症は多段階で進行するが、本研究では初めに食品の抽出物を調製し、⑤のマクロファージが泡沫細胞へと変化する段階に着目したスクリーニングを行う（図2）。そして、動脈硬化症の予防効果を示す機能成分の網羅的探索を行う。さらに、得られた食品機能成分の標的を明らかにする（図3）。

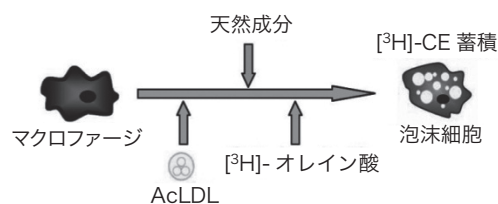
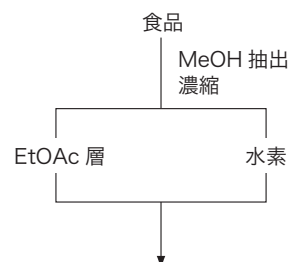


図2 泡沫化阻害試験



1. 泡沫化阻害試験
2. 阻害成分の精製
3. 阻害成分の構造決定
4. 阻害機構の解明

図3 研究の概要

実験方法

1. 食品からの抽出物の調製

22種類の食品をMeOH抽出し、エバポレーターで濃縮後の水溶液をEtOAcで分配した。そして、それぞれの食品についてEtOAc層と水層の両方をサンプルとして用いてスクリーニングを行った。用いた食品は以下のとおりである。玉ねぎ、長ネギ、大根、りんご、みか

ん、イチゴ、バナナ、紅茶、キウイ、晩白柚（皮と果肉部分からサンプルをそれぞれ調製した）、キャベツ、シークワサー、セロリ、白菜、金柑、きゅうり、人参、にんにくの芽、アボガド、トマト、ブルーベリー、かぼちゃ。

2. LDLの調製と化学修飾法

健常者のヒト血漿から連続遠心 (36,000 rpm, 20 hr, 4°C) により LDL ($d=1.019-1.063$ g/mL) を分離し、直ちに EDTA を含む生理食塩水 (EDTA-生理食塩水; 0.15 M NaCl and 1 mM EDTA (pH 7.4)) を用いて透析し使用した。AcLDL の調製は以下のように行った。20 mg の LDL に 5 mL の飽和酢酸 (LDL と等量の飽和酢酸を加えた) を加え、その後、氷上にて穏やかに攪拌しながら無水酢酸を 20 μ L 以下ずつ滴下した。次に、溶液を攪拌しながら氷上で 1 時間反応させ、5 N の NaOH を滴下して pH を 6.5-7.0 に調整した。その後直ちに EDTA-生理食塩水を用いて透析し、限界濾過法により濃縮した¹⁾。

3. ヒト単球由来マクロファージの調製

ヒト抹消血由来の単核球は、Ficoll 密度勾配遠心分離法 (Ficoll-Paque: Amersham bioscience) を用いて分離した。単球は平衡塩類溶液で洗浄後、Connor らの方法 (4°C で凝集した単球とその他の単核球に分離する方法で低温単球凝集法とよばれている) にしたがって単離した²⁾。単離した単球は、 2×10^6 cell/mL で RPMI 1640 に再懸濁し、6 cm dish に 2×10^6 cells、または 24 well plate に 2×10^5 cells/well (Falcon-PRIMARIA dish and plate: Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) の密度で播種した。37°C で 1 時間付着させた後、培養液を 10% 非働化ヒト血清及びストレプトマイシン硫酸塩 (0.1 mg/mL) とペニシリン G (100 units/mL) を添加した RPMI 1640 (glucose または mannitol を含む) に交換した。その後、培養液は 3 日毎に交換し、7-10 日間培養したものをヒト単球マクロファージとして実験に使用した。細胞は 5% CO₂ 存在下、37°C で培養した。

4. [³H] Oleic acid を用いた細胞内コレステロールエステル (CE) 蓄積量の測定

調製したヒト単球由来マクロファージを、24 well plates に播種し分化させた後、100 μ g/mL のサンプル存在下で、50 μ g/mL の AcLDL および 0.1 mM

[³H] oleic acid (5×10^3 dpm/nmol) を含む 3% BSA-PRMI 中で 24 時間培養した。その後、細胞を PBS で洗浄し、脂質抽出液 (hexane:2-propanol, 3:2) で 30 分間処理することにより細胞に含まれる脂質を抽出した。脂質抽出液を窒素ガスで乾固した後、100 μ L の 2-propanol で再懸濁した。その一部 (20 μ L) を標品 (AcLDL) とともに TLC シートにスポットし、展開溶媒 (hexane:diethylether:acetic acid, 90:10:1) を用いて展開後、ヨウ素で発色させ cholesteryl [³H] oleate 部分を切り取り回収した。同時に、展開しない 20 mL 分の脂質抽出液の放射活性を測定することにより、細胞内に取込まれた [³H] oleic acid 量を算出した。各々の放射活性は、回収した TLC シートに 3.5 mL の液体シンチレーションカクテルを加えた後、液体シンチレーションカウンターにて測定した。また、脂質抽出液の細胞タンパク量を BCA 法にて測定することで、cholesteryl [³H] oleate 量の補正を行なった。すなわち、500 μ L の 0.1 N NaOH を脂質抽出後の細胞に加えることで細胞を可溶化し、その一部 (50 μ L) に BCA 試薬を 1 mL 加え、37°C で 30 分間保温した後、562 nm の吸光度を測定した³⁾。

結果・考察

22 種類の食品から得られた 46 種類のサンプルを用いて、100 μ g/mL の濃度でスクリーニングを行った (図 4)。その結果、最も強く CE の蓄積を阻害したのは、アボガドで、次いで、きゅうり、ニンニクの芽、りんご、白菜、セロリであった。そして、いずれも EtOAc 層に活性があった。これらのうちアボガドについては、豊富に含まれる脂質⁴⁾の影響で、CE へと取込まれる [³H] oleic acid の量が減少したと考えられる。また、きゅうりにはトリテルペンが豊富に含まれていることが既に報告されている。^{5,6)} そして、植物に含まれるトリテルペンが CE の蓄積を阻害し、さらに動脈硬化を自然発症する粥状動脈硬化症モデルである ApoE 欠損マウスに経口投与すると、動物レベルで動脈硬化症の改善作用が認められることが明らかとなっているので^{7,8)}、きゅうり抽出物に含まれる CE 蓄積阻害成分はトリテルペンである可能性が高い。一方、りんごにもトリテルペンが豊富に含まれているが⁹⁾、りんごのポリフェノールや繊維が ApoE 欠損マウスの動脈硬化症を改善するという知見も既に報告されている¹⁰⁾。そこで、私たちは、白菜とセロリを研究対象として CE 蓄積阻害成分を探索し、それ

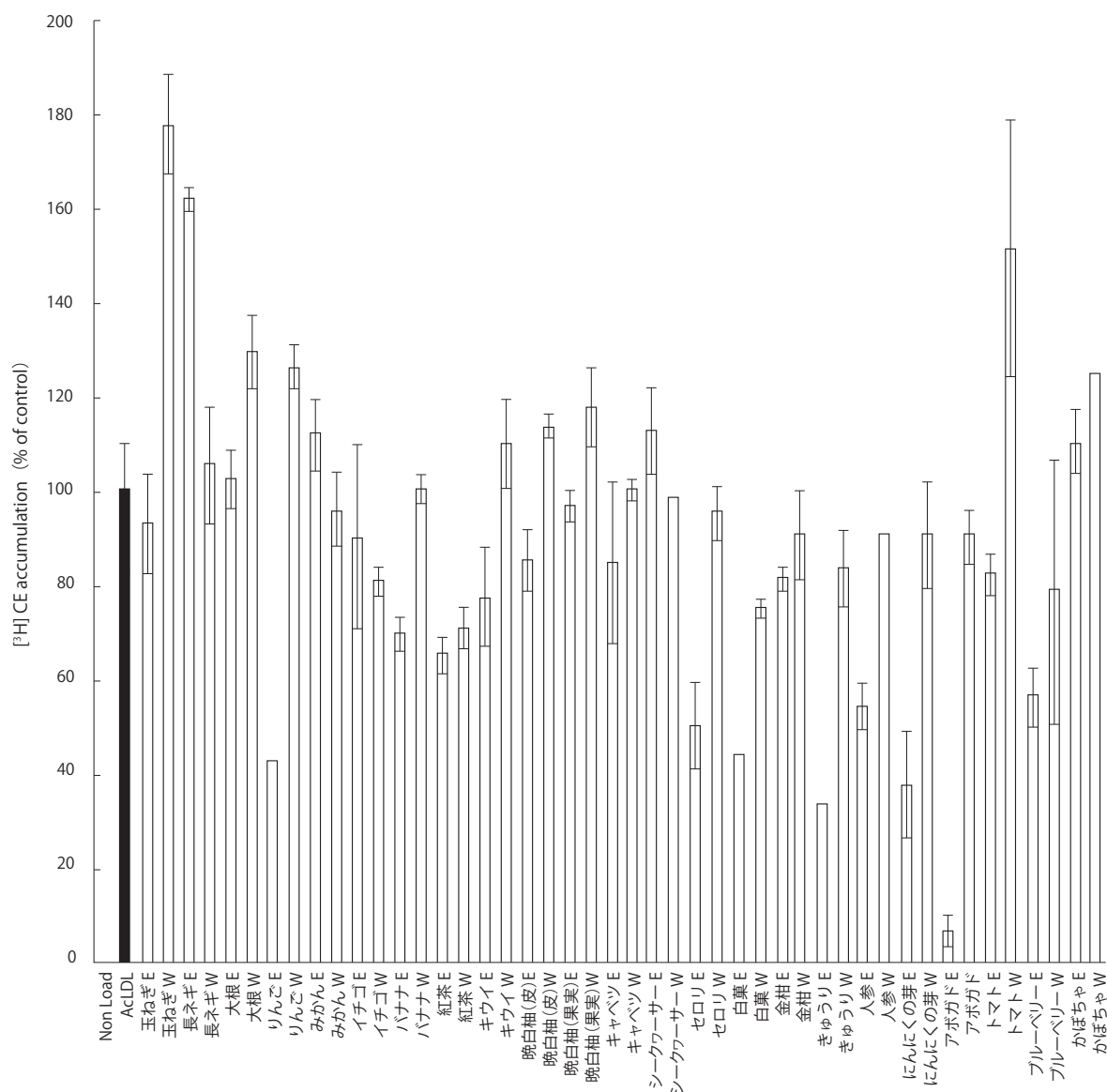


図4 食品の抽出物 (100 μg/mL) を用いた泡沫化阻害試験 (E, EtOAc 層; W, 水層)

ら成分の標的を明らかにする研究に着手した。

初めに白菜3個およびセロリ10束(1kg)から得られたMeOH抽出物を用いて、CE蓄積阻害作用を指標として分画を行った。その結果、両方のサンプルにおいて、比較的多くの成分が目的的作用を示しているという知見が得られた。そのため、初めに抽出した量では目的の成分を明らかにすることは困難と考えられたので、現在さらに白菜を20個、セロリを10kg抽出して成分の精製を行っている。また、成分の精製と並行して、白菜とセロリの抽出物そのものをApoE欠損マウスに経口投与し、病態の改善効果が認められるかどうかを調べる。

要約

本研究では、粥状動脈硬化症(アテローム性動脈硬化症)を予防・改善する食品機能成分に関する研究を行った。動脈硬化症は多段階で進行するが、本研究においては、マクロファージが泡沫細胞へと変化する段階に着目したスクリーニングを行った。そして、スクリーニングした22種類の食品の中から、コレステロールエステル(CE)の蓄積を顕著に阻害した白菜とセロリを用いて阻害成分の探索を行うこととした。白菜とセロリから既にいくつかの阻害成分を精製したが、得られた量が少なかったため、さらに白菜とセロリの量を増やして成分の精製を行っている。

謝 辞

本研究の遂行のため、公益財団法人三島海雲記念財団により研究助成を賜りましたことを深く感謝申し上げます。

文 献

- 1) A. Miyazaki, et al.: *J. Biol. Chem.* 269, 5264-5269, 1991.
- 2) R.I. Connor, et al.: *J. Immunol.* 145, 1483-1489, 1990.
- 3) A. Miyazaki, et al.: *Biochim. Biophys. Acta.* 1082, 143-151, 1991.
- 4) D. Kritchevsky, et al.: *J. Am. Coll. Nutr.* 22, 52-55, 2003.
- 5) K. Akiyama, et al.: *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 66, 762-769, 2002.
- 6) H. Kai, et al.: *Chem. Pharm. Bull.* 55, 133-136, 2007.
- 7) Y. Fujiwara, et al.: *Arterioscler Thromb. Vasc. Biol.* 27, 2400-2406, 2007.
- 8) Y. Fujiwara, et al.: *J. Agric. Food Chem.* 59, 4544-4552, 2011.
- 9) H. Xiangjiu, et al.: *J. Agric. Food Chem.* 55, 4366-4370, 2007.
- 10) S. Auclair, et al.: *J. Agric. Food Chem.* 56, 5558-5563, 2008.