

血管機能改善作用を有する新規機能性食品成分の解明

松井利郎 (九州大学大学院農学研究院食品バイオ工学講座)

1. 緒言

末梢の動脈（抵抗血管）の血管緊張が増大すると、血管内径の減少が起り、血流抵抗が増大する。血圧は心拍出量と末梢血流抵抗の積にはほぼ比例するため、抵抗血管の収縮制御は、血圧の維持・調節において重要な役割を担っている。

血管は内膜・中膜・外膜の3層からなり、そのうち中膜に存在する平滑筋細胞（VSMC）は通常、血管作動物質（Angiotensin (Ang) II など）の刺激に反応して収縮・弛緩する（Fig.1）。高血圧による血行動態上の変化は、抵抗血管において中膜の平滑筋細胞の肥大と過形成、細胞外マトリッ

クスの増加、コンプライアンスの低下、抵抗の増加などを特徴とする適応変化を起こさせる。この適応りモデリング応答は、壁応力を正常化し、血管反応性の増加をもたらす。こうした血管の変化自体が、血管収縮を増幅し、高血圧を継続させ、粥状硬化などの合併症の進展を促進する。

これまでの研究により、収縮・弛緩に関係する作動物質が平滑筋の増殖や肥大を起こすことが明らかになってきた¹⁻⁵⁾。増殖因子は血管収縮因子として作用し、同様に血管収縮因子は平滑筋細胞の増殖や過形成を引き起こす。中でも、様々な組織に存在するレニン-アンジオテンシン系（RAS）において、特に血管組織で産生された

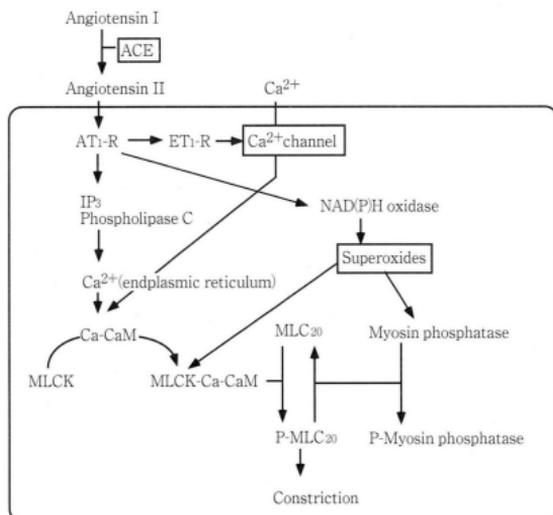


Fig. 1 Constrictive mechanism of vascular smooth muscle cell (VSMC).

Ang IIは高血圧の発症・維持や血管病変の形成と密接に関係することが示されている⁶⁾。RASにおいて血圧上昇の鍵となる因子であるAng II刺激によるVSMCの増殖・肥大は、AT₁-R antagonist⁷⁾、Ca²⁺ channel blockerであるAmlodipine⁸⁾、インスリン抵抗性改善薬であるTroglitazone⁹⁾、DHA/EPA¹⁰⁾、植物sterolである β -sitosterol¹¹⁾など、様々な化合物もしくは天然物で制御されることが報告されている。しかしながら、その増殖抑制機構はアンジオテンシンレセプター阻害によるRAS抑制の他は、MAPキナーゼ阻害⁹⁾、Cdk-cyclinのリン酸化阻害¹⁰⁾など細胞内シグナル伝達系への関与が一部に疑われているのみであり、明確にされてないのが現状である。

そこで本研究では、天然ACE阻害ペプチドであるVYが、組織系RAS、特に胸部大動脈におけるRASを阻害するとの知見¹²⁾に基づき、血管収縮に直接関わるヒトVSMCを用いて、Ang II刺激により誘導される細胞肥大抑制作用を有し、新たな高血圧・動脈硬化予防（血管機能改善作用）が期待される食品成分の解明とその制御機構を明らかにすることを試みた。

2. 材料及び方法

2.1 材料

正常ヒト大動脈血管平滑筋細胞（VSMC）、平滑筋細胞用基礎培地（SmBM）、hEGF（0.5 μ g/ml）、insulin（5 mg/ml）、hFGF-B（1 μ g/ml）、FBS、GA-1000（SmGM-2添加因子セット）、0.05%トリプシン/0.02%EDTA液、トリプシン中和液、HEPES緩衝液（継代試薬セット）（以上、三光純薬工業）、Trypan Blue cell stain（和光純薬工業）、Cell-Counting Kit-8（同仁化学）、Val-Trp（VW）、Ile-Trp（IW）、Ile-Tyr（IY）（以上、国産化学）、Angiotensin II、Bay K 8644、captopril（以上、Sigma）、Saralasin（Nacalai

Tesque）を使用した。また、Ile-Val-Tyr（IVY）はFmoc-Tyr（BUT）-O-polymer、Fmoc-Val、Fmoc-Ile（以上、国産化学）を用いて固相合成した。また、ルテオリン、カフェ酸、フェルラ酸、クマル酸はNacalaiTesque社製のをそのまま使用した。試薬類は超純水を125℃、20分間オートクレープし、滅菌水としたものに溶解するか、もしくは培地に溶解して使用した。ピペット類は180℃、5時間乾熱滅菌したものを使用した。

2.2 細胞培養

SmBMに添加因子を全量加え、増殖培地（SmGM）を調製した。凍結細胞を適当量のSmGMに懸濁し、24-multi well plateに1.5 mlずつ播種した。plateを37℃、5% CO₂ インキュベーター内で保存した。70～90%コンフルエント（サブコンフルエント）になるまで培養し、上清を吸引除去した。適当量のSmGMを加えて懸濁し、1.5 mlずつ24-multi well plateに播種した。以後、2日おきに培地交換を行い、継代操作を繰り返した。保証分裂回数より、継代数7-10の細胞を実験に供した。counting chamberを用いて生細胞をカウントし、細胞を 1×10^5 cells/mlとなるようにSmBMで希釈し、これを1.5 mlずつ24-multi well plateに播種した。血清中のサイトカインや増殖因子を取り除くため、24時間無血清下にて培養した。24時間後、培地を除去し、血清培地であるSmGMを1.4 ml加え、終濃度10、50、100 μ Mに調製した各種試料溶液を0.1 mlずつ添加した。コントロールとして滅菌水を0.1 ml添加した。2日及び4日後に培地交換とサンプル添加を行い、5日後に細胞剥離後、Trypan Blue assayにより生細胞数のカウントを行った。

2.3 WST-8 Assay

前項と同様、24-multi well plateにて培養し、サブコンフルエントとなったものを実験に用いた。この細胞を 1×10^5 cells/mlとなるようにSmBM

で希釈し、96-multi well plate の各 well に $100 \mu\text{l}$ ずつ播種した。37°C, 5% CO_2 インキュベーター内で24時間前培養した。目的の濃度に調製した被験化合物を各 well に $10 \mu\text{l}$ ずつ添加したのち、SmBM を $100 \mu\text{l}$ ずつ加え、5% CO_2 インキュベーター内で48時間培養した。この際、細胞内酵素によるペプチド分解を考慮し、培養24時間目に培地を吸引除去し、試薬添加及び培地交換を再度行った。

培養48時間後、Cell-Counting Kit-8 溶液（水溶性ホルマザン、WST-8；チミジン取り込みと同等指標）を各 well に $100 \mu\text{l}$ ずつ添加し、 CO_2 インキュベーター内で3時間呈色反応を行った。反応後、Wallac 1420 MULTILABEL COUNTER (Perkin Elmer) を用いて発色量を測定した（測定波長：450 nm）。なお、Bay K 8644 を用いた WST-8 assay の場合、目的の濃度に調製した薬剤を各 well に $10 \mu\text{l}$ ずつ添加したのち、Bay K 8644 を溶解した SmBM を $100 \mu\text{l}$ ずつ加え、5% CO_2 インキュベーター内で6日間培養した。この際、細胞内酵素によるペプチド分解を考慮し、培養48時間ごとに培地を吸引除去し、試薬添加及び培地交換を再度行った。培養6日後、WST-8 を各 well に $100 \mu\text{l}$ ずつ添加し、 CO_2 インキュベーター内で4時間呈色反応を行い、前述と

同様に発色量を求めた。

2.4 DPPH ラジカル捕捉活性測定

DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, 和光純薬製) を用いた抗酸化性試験は以下の通り行った。すなわち、試験管に 0.1 M MES buffer (pH 6.8) 1.6 ml に対して、各種濃度の被験試料 0.4 ml-ethanol を添加し、試料溶液とした。次に、本溶液に対して $400 \mu\text{M}$ DPPH/ethanol を 1.2 ml 添加することにより、アッセイを開始した。添加後の吸光度変化 (517 nm) を連続的にモニターし (Multi Spec-1500, 島津製作所製)、得られた吸光度変化の傾きから被験試料の DPPH ラジカル捕捉活性 ($U = \mu\text{mol (DPPH)}/\text{ml}/\text{min}/\text{mol}$) を見積もった。

3. 結果及び考察

3.1 抗酸化性化合物による平滑筋細胞増殖抑制作用の発現

カフェ酸をはじめとしてラットレベルでの血圧低下作用が報告されているフェノール酸類及び抗酸化的作用が知られているルテオリン (Fig. 2) を用いて、ヒト血管平滑筋細胞 (VSMC) に対する増殖抑制効果を検討した。まず、無血清培養下での VSMC に対する各化合物の細胞毒性を検討した。その結果、コントロール群と比較して、

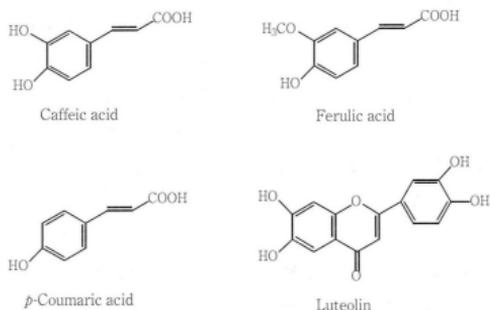


Fig. 2 Flavonoid (luteolin) and phenolic acids used in this study.

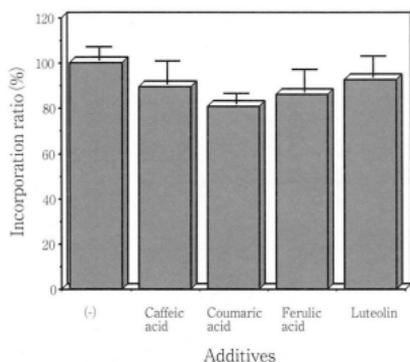


Fig. 3 Cytotoxicity of phenolic acids and luteolin on human VSMCs.

Data were obtained after 48 h-incubation of VSMCs (1×10^6 cells/ml) in a serum-free medium in an atmosphere of 5% CO_2 and 95% O_2 air at 37 °C. Concentration of each compound was set at 0.1 mM, and cytotoxicity was determined by the WST-8 incorporation assay. Data are the mean \pm SE of four different cell cultures.

0.1 mM 濃度の添加によっても有意な WST-8 取り込み量に変化が認められなかったことから (Fig. 3), 供試したフェノール体はいずれも VSMC に対して毒性作用を示さないと判断された。

そこで, 1.0 μM Ang II を培地に添加し, AT1-R 刺激を介して細胞増殖を刺激することにより, 各種フェノール酸 (0.1 mM) の抗 VSMC 増殖作用を明らかにした。その結果, Fig. 4 で示したように, Ang II 添加によって VSMC は有意に ($p < 0.01$) 増殖したが, 0.1 mM フェノール酸類の添加群では Ang II 刺激による増殖挙動は異なる結果となった。すなわち, カフェ酸, クマル酸, フェルラ酸では有意な増殖抑制効果は認められなかったものの, ルテオリンにおいては明らかな VSMC 増殖抑制効果が発現し, Ang II 添加群に対して 55% ($p < 0.01$) の顕著な増殖抑制効果を示した。また, ルテオリンによる本効果の発現挙動は濃度依存的 (1, 10, 50, 100 μM) であり (Fig. 5), 本アッセイ条件下での抗 VSMC 増殖活性 (IC_{50}) は 97 μM であると思積られた。

本抑制効果を明らかにするため, DPPH ラジ

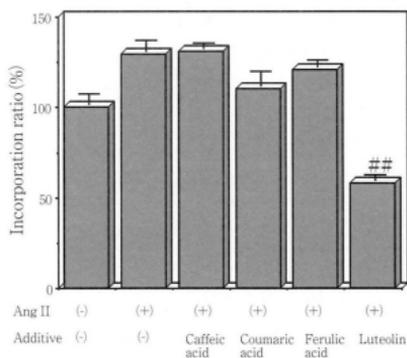


Fig. 4 Effect of phenolic acids and luteolin on Ang II (1.0 μM)-induced VSMC proliferation.

Data were obtained after 48 h-incubation of VSMCs (1×10^6 cells/ml) in a serum-free medium in an atmosphere of 5% CO_2 and 95% O_2 air at 37 °C. Concentration of each compound was set at 0.1 mM, and cell proliferation was determined by the WST-8 incorporation assay. Data are the mean \pm SE of four different cell cultures. Statistical significance was assessed by Dunnett's *t*-test for *post hoc* analysis. # $p < 0.01$ vs. Ang II-group.

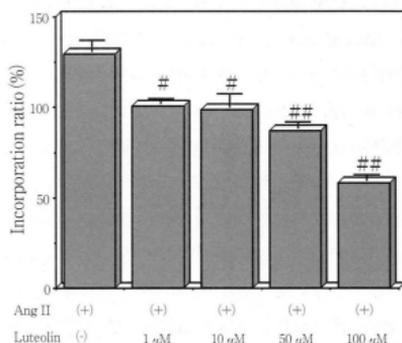


Fig. 5 Dose-dependency of luteolin on the reduction of WST-8 incorporation in the VSMCs in a serum-free medium.

Data are the mean \pm SE of four different cell cultures. Statistical significance was assessed by Dunnett's *t*-test for *post hoc* analysis. # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$ vs. Ang II-group.

カル捕捉活性を求めたところ, Table 1 で示したようにルテオリンは他の化合物と比べて 3-20 倍以上の高い抗酸化性を示し, 抗 VSMC 増殖挙動 (Fig. 4) の発現と DPPH ラジカル捕捉活性との間に良好な相関が認められた。さらに, データは示していないがいずれの化合物も Ang II 産生酵素である ACE に対する阻害作用は認められな

Table 1 DPPH radical trapping activity of phenolic acids and luteolin

	DPPH trapping activity (U/mol)	Relative activity ^a (%)
Luteolin	614.3	100
Caffeic acid	218.0	35.5
p-Coumaric acid	52.5	8.5
Ferulic acid	37.3	6.1

^aRelative activity of each compound against luteolin.

DPPH assay was performed at the condition of 400 μ M of DPPH at RT.

Absorption change of DPPH at 517 nm with time was monitored with UV-VIS spectrophotometer.

Slope obtained from the absorption curve was used for DPPH radical trapping activity (U=mmol(DPPH)/ml/min).

った (IC₅₀>1.0 mM)。以上のことから、Fig. 1 で示した Ang II 添加による VSMC 増殖刺激経路において、ルテオリンは NAD (P) H オキシダーゼ活性化後のスーパーオキシド産生の抑制、すなわち SOD 様作用を発現していることが強く示唆され、ルテオリンをはじめとする抗酸化性フラボノイド類は細胞内のリン酸化酵素活性化抑制に基づく MLCK and/or ミオシンフォスファターゼの賦活化抑制を介して、抗増殖的に作用するものと推察された。これまで、カフェ酸あるいはフェルラ酸等のフェノール酸は神経伝達系におけるメディエーターとして作用することにより血圧を低下させることが報告されている¹³⁾。一方、抗酸化性フラボノイドによる血圧低下作用についての報告例はなく、本知見は食品成分であっても血管障害を抑制し、高血圧、ひいては動脈硬化の予防に資することを強く示唆するものであり、今後 in vivo での検証 (血圧低下作用並びに腸管吸収性を指標とした抗酸化性食品成分の検索と同定) を通して新たな食品機能が提示できるものと期待される。

3.2 ACE 阻害ペプチドによる平滑筋細胞増殖抑制作用の発現

血圧低下作用を示す食品成分としては ACE 阻害作用を有するペプチドがその代表であり、すでにヒトレベルでその効果が実証されている^{14, 15)}。そこで、ACE 阻害作用を示す活性低分子ペプチ

Table 2 Angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity of peptides used in this experiment

peptide	IC ₅₀ value (μ M)
IY	3.7
IW	2.0
VW	1.6
IVY	0.5

ACE inhibitory assay was performed according to Lieberman's method using Hip-His-Leu as a substrate at 37°C for 60 min.

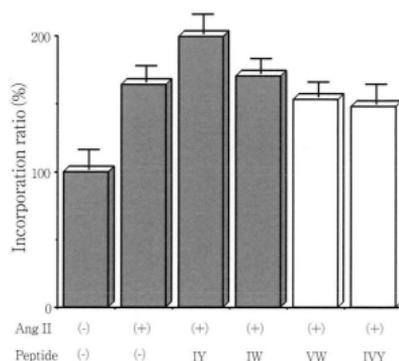


Fig. 6 Effect of ACE inhibitory peptides on Ang II (1.0 μ M)-induced VSMC proliferation.

Data were obtained after 48 h-incubation of VSMCs (1×10^5 cells/ml) in a serum-free medium in an atmosphere of 5% CO₂ and 95% O₂ air at 37°C. Concentration of each peptide was set at 1.0 mM, and cell proliferation was determined by the WST-8 incorporation assay. Data are the mean \pm SE of four different cell cultures.

ド体 (Table 2) を用いて抗 VSMC 増殖活性を検討し、血管組織に対する機能改善作用の解明を試みた。

Fig. 6 で示したように、Ang II 添加により誘導された VSMC の WST-8 取り込み量の増大に対して 1.0 mM IY, IW は全く影響を及ぼさなかった。それに対して、VW 及び IVY はそれぞれ Ang II 添加による増殖を 11.3%, 16.4% 抑制し、これらペプチドが抗 VSMC 増殖的に作用する新規な機能体であることが示された。他方、Watanabe ら¹⁶⁾ による報告と同様、ACE 阻害剤である captopril (ペプチド体との ACE 阻害活性を考慮して 1.0 μ M 添加) ではこの作用は全く認められなかった (Fig. 7) ことから、Fig. 6 で明

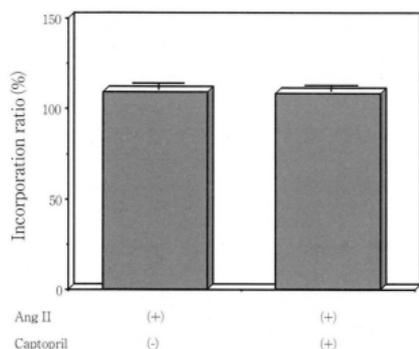


Fig. 7 Effect of captopril ($1.0 \mu\text{M}$) on of Ang II ($1.0 \mu\text{M}$)-induced VSMC proliferation.

Data were obtained after 48 h-incubation of VSMCs (1×10^5 cells/ml) in a serum-free medium in an atmosphere of 5% CO_2 and 95% O_2 air at 37°C . Data are the mean \pm SE of four different cell cultures.

らかとなった増殖抑制作用は ACE 阻害作用ではなく、VSMC に対してペプチドが新たな生理機能を発現していることを示唆するものであった。なお、本増殖抑制効果は Ang (1-7) の $1.0 \mu\text{M}$ や des-aspartate-angiotensin I の $5.0 \mu\text{M}$ ¹⁷⁾、 AT_1 拮抗薬である candesartan の $1.0 \mu\text{M}$ ¹⁶⁾ と比較すると高容量を必要とするが、その抑制が細胞毒性でない以上、血管機能を改善する上でペプチドによるこの新たな知見は非常に意義が大きいと考えられる。

3.3 低分子ペプチドによる抗 VSMC 増殖抑制機構の解明

データは示さないが、これらペプチドには全く DPPH 捕捉活性は認められなかったことから、ルテオリンとは異なる作用機構でペプチド体は VSMC の増殖を抑制すると推察される。**Fig. 1** で示したように、平滑筋細胞増殖機構のひとつとして、 Ca^{2+} 流入量の増大あるいは Ca^{2+} 感受性の発現があげられる。すなわち、脱分極により L 型電位依存性 Ca^{2+} チャンネルが開くと、 Ca^{2+} 流入 \rightarrow 細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇 \rightarrow 収縮が起こること

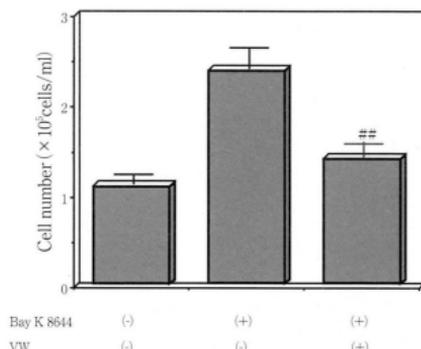


Fig. 8 Effect of VW (1.0mM) on Ca^{2+} channel agonist ($1.0 \mu\text{M}$, Bay K 8644)-induced VSMC proliferation.

Data were obtained after 48 h-incubation of VSMCs (1×10^5 cells/ml) in a serum-free medium in an atmosphere of 5% CO_2 and 95% O_2 air at 37°C . Cell number was determined by Trypan blue assay. Data are the mean \pm SE of three different cell cultures.

から、この開口を阻害することにより脱分極時に Ca^{2+} 流入が起こらず、平滑筋、心筋の収縮性が抑制される。そこで、細胞増殖に対して直接的な刺激因子となる Ca^{2+} 流入に対するペプチドの作用を検討した。

Ca^{2+} チャンネルアゴニストである $1.0 \mu\text{M}$ Bay K 8644¹⁸⁾ を用いて、 Ca^{2+} 流入刺激に伴う VSMC 増殖促進に及ぼす VW の抗増殖抑制作用を検討した (**Fig. 8**)。その結果、Bay K8644 刺激による細胞増殖 ($2.3 \pm 1.1 \times 10^5$ cells/ml) を 1.0mM VW は明らかに抑制した ($1.4 \pm 1.0 \times 10^5$ cells/ml)。このことは、VW が Ca 拮抗薬と同様の作用機構、すなわち電位依存性 Ca^{2+} チャンネルをブロックする働きを有していることを示唆するものであった。FURA2-AM 等プローブを用いた細胞内 Ca^{2+} 濃度の測定が必須となるが、ペプチド体による Ca^{2+} チャンネルブロックの報告例は未だかつてなく、本研究が初めてである。今後は、 Ca^{2+} チャンネルブロック作用の発現機構をペプチド構造との関連のもとに解明する必要がある。

4. おわりに

食品成分による血管機能改善作用について、新たな潜在的生理機能を提示する研究機会を与えていただきました浦上食品・食文化振興財団に厚く御礼申し上げます。

参考文献

- 1) Bradford C.B., Vldimir V., Gordon H.M.: *Hypertension*, 13, 305-314, 1989.
- 2) Andrawis N.S., Wang E., Abernethy D.R.: *Life Sciences*, 59, 523-528, 1996.
- 3) Gui-Nan Xio., Yong-Yuan Guan., Hua He.: *Life Sciences*, 70, 2233-2241, 2002.
- 4) Marshall P.R., Mcanulty J.R., Laurent J.G.: *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 161, 1999-2004, 2000.
- 5) Sato M., Ohsaki Y., Tobise K.: *Am. J. Hypertension*, 8, 160-166, 1995.
- 6) Dzau, V.J. et al.: *Circulation*, 87, 705, 1993.
- 7) Makita S., Nakamura M., Yoshida H., Hiramori K.: *Pharmacology letter accelerated communication*, 56, PL383-PL388, 1995.
- 8) Stepien O., Iouzalén L., Herembert T., Marche P.: *Int. J. Cardiology*, 62, S79-S84, 1997.
- 9) Graf K., Xio-Ping Xi., Willa A.Hsueh., Ronald E.Law.: *FEBS Letters*, 400, 119-121, 1997.
- 10) Terano T., Tanaka T., Higashi H., Saito Y., Hirai A.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 254, 502-506, 1999.
- 11) B.Awad A., Smith A.J., Fink C.S.: *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 64, 323-330, 2001.
- 12) Matsui T., Imamura H., Oka H., Osajima K., Kimoto K., Kawasaki T., Matsumoto K.: *J. Peptide Sci.*, 10, 535-545 (2004).
- 13) Suzuki A., Kagawa D., Ochiai R., Tokimitsu I., Saito I.: *Hypertension Res.*, 25, 99-107, 2002.
- 14) Kawasaki T., Seki E., Osajima K., Yoshida M., Asada K., Matsui T., Osajima Y.: *J. Human Hypertens.*, 14, 519-523, 2000.
- 15) Hata Y., Yamamoto M., Ohni M., Nakajima K., Nakamura Y., Takano T.: *Am. J. Clin. Nutr.*, 64, 767-771, 1996.
- 16) Watanabe T., Pakara R., Kataguri T., Benedict R.C.: *Atherosclerosis*, 159, 269-279, 2001.
- 17) Min L., Sim M.K., Xu X.G.: *Regulatory Peptides*, 95, 93-97, 2000.
- 18) Yoo H J., Kozaki K., Akishita M., Ouchi Y *et al.*: *Atherosclerosis*, 131, 167-175, 1997.

Elucidation of Bioactive Food Components to Serve in Improving Vascular Remodeling

Toshiro Matsui (Kyushu University)

It has been demonstrated that some food compounds have diverse physiological functions, especially antihypertensive effect, so that many physiologically functional foods named as FOSHU have been successfully developed in Japan. However, most of antihypertensive studies by natural compounds have been focused on peptides having ACE inhibitory activity, though diverse blood pressure systems occur in the body. Thus, in this study first attempts were made to clarify whether food components having an antioxidative activity or ACE inhibitory activity could have an alternative function to suppress a promotion of blood pressure and to prevent a sclerosis through a suppression of vascular smooth muscle cell (VSMC) proliferation.

To clarify an anti-proliferation effect (control of excess vasoconstriction) of food compounds, their actions of the following three metabolic systems were investigated: suppression effect of 1) Ca^{2+} incorporation via L-type Ca^{2+} channel activation, and 2) Ca^{2+} -sensitive proliferation via redox-sensitive phosphatase activation in the cell. As a result,

- 1) Luteolin showing potent DPPH radical trapping activity significantly ($p < 0.01$) among some phenolic acids used in this study suppressed a VSMC proliferation induced by the addition of $1.0 \mu\text{M}$ of angiotensin (Ang) II by a factor of 55 %. The suppression activity (IC_{50} value) was estimated to be $97 \mu\text{M}$. Considering that luteolin had no power of ACE inhibitory activity and no toxicity against the cell, antioxidative compounds including luteolin was found for the first time to have a latent ability to improve vascular remodeling via a suppression of redox-sensitive phosphatase activation by superoxides.
- 2) Some peptides (VW and IVY) with potent ACE inhibitory activity showed an anti-proliferative effect in Ang II-stimulated VSMC. This indicated that these peptides had an alternative physiological function for blood pressure control systems. The result that these peptides significantly suppressed a proliferation of Ca^{2+} channel agonist (Bay K 8644) -stimulating human VSMC (control; $2.3 \pm 1.1 \times 10^5$ cells/ml, 1.0mM VW; $1.4 \pm 1.0 \times 10^5$ cells/ml) revealed that they played a physiological role in regulating vascular remodeling through an L-type Ca^{2+} channel blocking action.