

カカオポリフェノール代謝物による ヒト血管内皮細胞ストレス反応の抑制

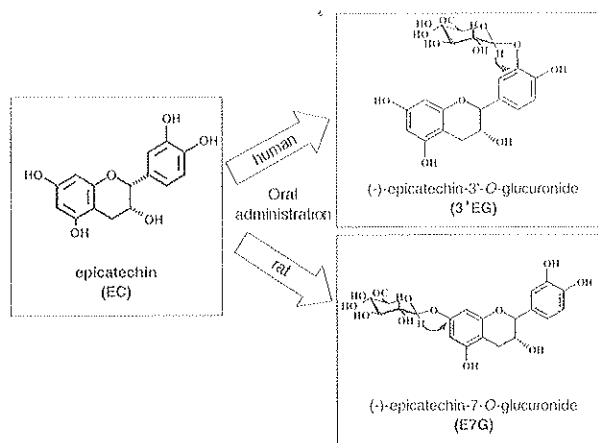
大澤 俊彦 (名古屋大学大学院生命農学研究科)

ゲノムプロジェクトにより様々な生物種のゲノム情報が明らかにされ、我々は誰でもヒトやマウスの遺伝子情報を共有することが出来るようになった。現在はこれらの遺伝子情報をどのように活用するかというポストゲノムの時代といわれて久しい。

ヨーロッパに端を発した「Nutrigenomics」は、NutritionとGenomicsを足し合わせた造語であり、「ヒトや実験動物の体の中で、栄養素や食物成分がどのように機能しているかを遺伝子レベルで評価する研究・技術である」と言え、ここで言うGenomicsとは広義の意味でTranscriptomics、Proteomics、Metabolomicsを含むと考えられる。このなかでも遺伝子の転写産物であるmRNA存在量を定量するTranscriptomicsの技術分野の進展は著しく、GeneChip (Affymetrix社)に代表されるDNAマイクロアレイ技術を用いることにより、これまで個々もしくは断片的にしか調べることのできなかった遺伝子発現レベルの変化を網羅的(数千~30,000遺伝子)に分析することが可能となった。

我々はこれまでカカオポリフェノールの抗動脈硬化作用について実験動物モデルを用いて詳細に検討し、その作用を確認してきた。また臨床試験ではココアを摂取することでLDLの酸化が抑制されることから、カカオポリフェノールの有する抗酸化作用が動脈硬化の抑制メカニズムであると考えてきた。これまで報告してきたように、カカオポリフェノールの約10%は(-)-epicatechin (EC)であり、残りはECが重合したprocyanidinである。ところがこれらの生体利用性を比較すると、二量体であるprocyanidin B2が0.4%程度の吸収率性しか示さないのに対し、ECは約30%と高い生体利用性を示すことから抗酸化作用は血中に分布したECによるものであると推定された。しかしながら、ECは生体内に入るとメチル化や抱合化など代謝を受けることが報告されている。そこでこれら代謝物の化学構造を明らかにしたところヒトとラットでは全く異なることが明らかとなった。すなわちヒトの主要な代謝物はB環の水酸基が修飾された(-)-epicatechin-3'-O-glucuronide (3'EG)であったのに対し、ラットの主要な代謝物はA環の水酸基が修飾された(-)-epicatechin-7-O-glucuronide (E7G)であり(図1)、ラット由来の代謝物には抗酸化性が比較的維持されていたが、ヒト由来の代謝物ではほとんど抗酸化活性が認められなかった。そこで、今回、LDL酸化抑制作用以外のこれらの代謝物の作用を検討するためヒト臍帯血管内皮細胞(HUVEC)を用いた実験を行った。

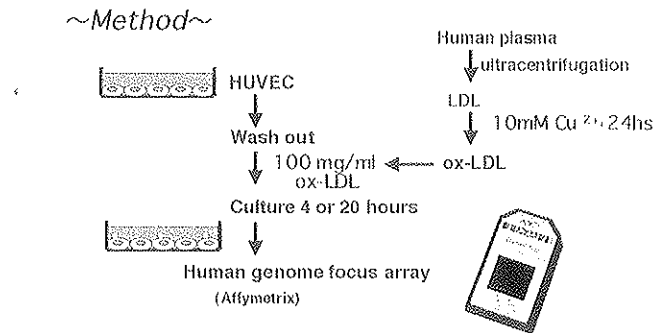
図1



1. 酸化LDL刺激がヒト臍帯血上皮細胞 (HUVEC) の遺伝子発現へ及ぼす影響

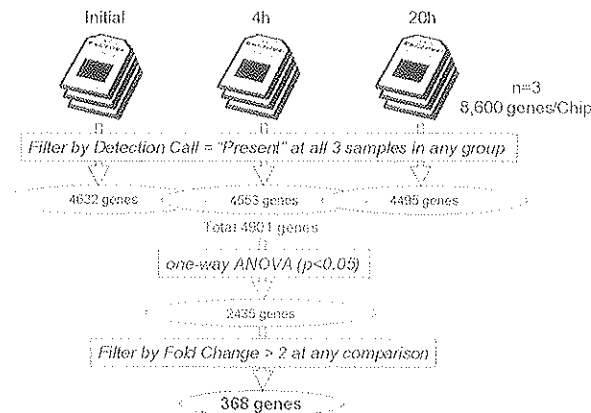
実験に用いた酸化LDLは、健常者のLDLを銅イオンと共に24時間培養して調製した。HUVECはコンフルエントの状態にまで培養した後に上清を除き、100 μ gの酸化LDLを加え4時間または20時間培養した細胞のmRNAを抽出・精製し、遺伝子発現の変化をAffimetrix社製Human Genome Focus Arrayを用いて評価した (図2)。

図2 The gene Expression in Human Umbilical Vein Endothelial Cells (HUVEC) Stimulated by Ox-LDL Using DNA Microarray method



GeneChip解析は酸化LDL刺激前 (イニシャル)、酸化LDL刺激後4時間、20時間の各群において、3反復で行った。それぞれのChipについて単解析を行った後、図に示したように、「Detection Call」、「one-way ANOVA」、「発現量変化が2以上」の3段階のクライテリアを設け、これら3群間で有意に発現が変動した、すなわち、酸化LDL刺激によりHUVECにおいて発現が変動したと認められる368遺伝子を抽出した (図3)。

図3 Flowchart of steps for implementation of statistical analysis and our comprehensive cutoff points for data mining. Data analysis was performed with GeneSpring software.



酸化LDL刺激により発現が変動した368遺伝子を、その発現パターンにより階層的クラスター解析に供した結果、5つのクラスターを得た (図4)。グループ1、2は酸化LDL刺激により継続的にDown-regulateされる遺伝子群、グループ3は一時的にUp-regulateされその後発現量がもとに戻る、もしくはDown-regulateされる遺伝子群、グループ4は継続的にUp-regulateされる遺伝子群、グループ5は一時的にDown-regulateされその後発現量がもとに戻る、もしくはUp-regulateされる遺伝子群である。

各グループに分類された遺伝子を生理機能別にさらに分類した結果を表1に示した。グループ1及び2には細胞機能の維持例えば増殖・分化や細胞骨格などに関する遺伝子の発現変動が比較的多く

図4 Hierarchical Clustering of 368 Genes, Whose Expressions were Regulated by ox-LDL Stimulation, with their Expression Patterns

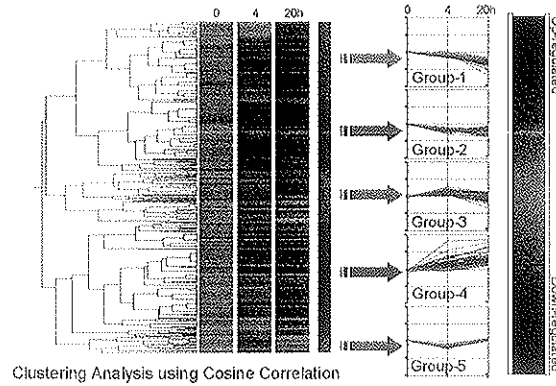
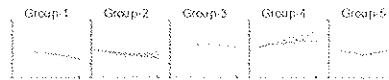


図5 Classification of 368 Genes; Whose Expressions were Regulated by ox-LDL Stimulation, by their Biological Function

Biological Function	Group-1	Group-2	Group-3	Group-4	Group-5
Cell, Development	28	38	19	26	5
Cell proliferation, Cell cycle,	15	36	10	16	2
Cell growth and/or maintenance					
Cell adhesion, Cell mobility	6	1	1	3	1
Extracellular matrix	1	6	2	3	1
Cytoskeleton	3	1	2	1	0
Development	3	6	3	3	1
Others	0	0	1	0	0
Cell death, Apoptosis, Necrosis	5	3	1	7	3
Inflammatory response, immune response	6	4	7	10	1
Stress response, Heat shock response	4	6	3	12	0
Metabolism, Transport	16	2	7	29	0
Others	29	24	20	43	10
Total	88	77	57	127	19
			369		



認められ、グループ3及び4には動脈硬化に関与するという遺伝子群、例えば炎症反応・酸化や熱に対するストレス反応あるいはアポトーシス・ネクローシスに関するものが多く認められた。グループ5に分類された遺伝子数は比較的少なく、動脈硬化との関連性は認められないものがほとんどであった (図5)。

2. 酸化LDL刺激によるヒト臍帯血上皮細胞 (HUVEC) の遺伝子発現に対するEC代謝物の影響

検討は実験1と同様に実施し、30 μ MのEC・(-)-epicatechin-3'-O-glucuronide (3'EG、ヒト由来代謝物) 及び(-)-epicatechin-7-O-glucuronide (E7G、ラット由来代謝物) また200 μ MのN-acetylcystein (NAC) を陽性対照として添加した。1の実験で経時的な発現が増加した遺伝子群、特に酸化ストレス関連遺伝子 (hemeoxygenase-1・thioredoxin reductase・glutathione reductase・glutamin cystein ligase)、炎症関連遺伝子 (IL-8・COX-2・VCAM)、細胞死関連遺伝子 (TNFSF15・TNFSF18) についての作用をリアルタイムPCRを用いて検討した。酸化ストレス関連遺伝子に関しては、EC及びその代謝物はグルタチオン代謝を促進し、NACは反対に抑制することが判った。hemeoxygenase-1・thioredoxin reductaseに対してはEC及びその代謝物は遺伝子発現を抑制し、NACは反対に促進することが判った (図6)。IL-8及びCOX-2については、EC関連物質・NACともに発現の促進効果を示し、VCAMに関しては全ての化合物が発現抑制作用を示した (図7)。細胞死関連遺伝子についてはEC関連物質は抑制作用、またNACは促進作用を示した (図8)。

図6 Cacao polyphenol metabolites altered of mRNA expression in HUVEC stimulated by ox-LDL ~stress response~

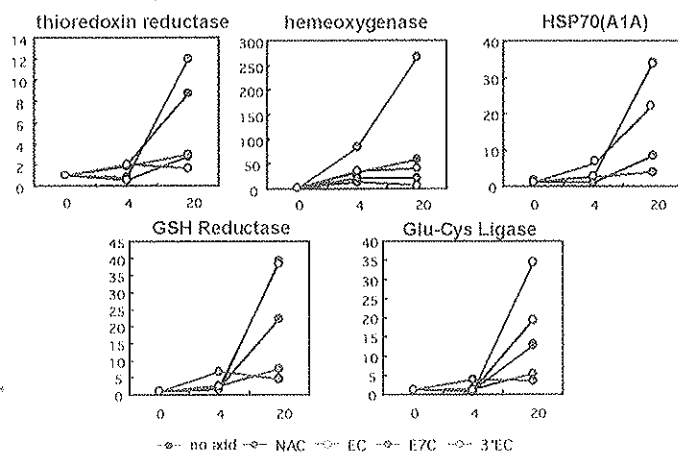


図7 Cacao polyphenol metabolites altered of mRNA expression in HUVEC stimulated by ox-LDL ~Inflammatory response~

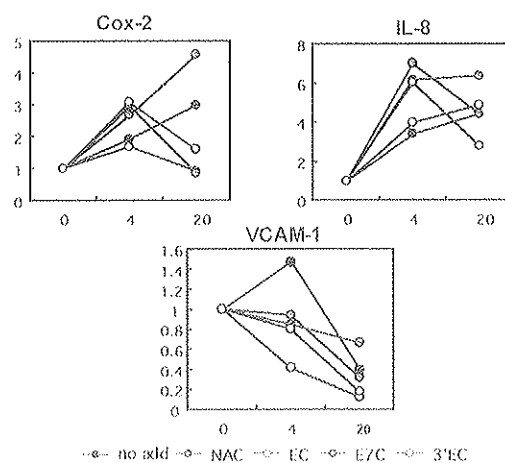
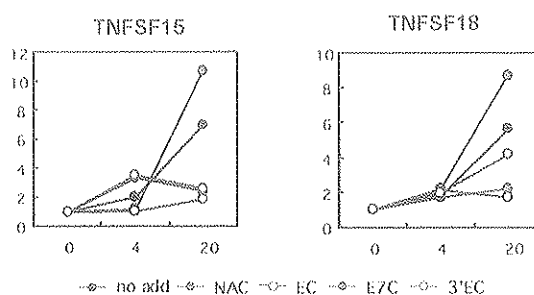


図8 Cacao polyphenol metabolites altered of mRNA expression in HUVEC stimulated by ox-LDL ~Necrosis/Apoptosis~



以上のことから、カカオポリフェノールは、酸化LDLによって引き起こされる血管内皮細胞のストレス反応に対して修飾作用を示すことがわかった。これらの作用がカカオポリフェノールの動脈硬化抑制作用の一因になっていると示唆される。