カカオポリフェノールによる心不全改善効果

森本　達也
静岡県立大学薬学部分子病態学分野教授

1．はじめに

運動不足や欧米型の食生活などにより内臓脂肪が蓄積し、高血圧、糖尿病、脂質異常症などが発症するメタボリックシンドロームは、心筋梗塞や脳梗塞の原因となる動脈硬化を急速に進行させることが問題となっている。心不全はこれら心筋梗塞や高血圧性心疾患などあらゆる心疾患の最終像であり、わが国の死亡原因の第2位である。昨今高齢者の増加に伴い、心不全患者数が大幅に増加すること＝「心不全パンデミック」が予想されている[1]。心不全に対する根本的な治療薬はなく、予後は悪く、医療経済的にも大きな問題である。チョコレートの原料であるカカオ豆にはポリフェノールが多く含まれていることから、健康維持に役立つと考えられている。カカオ豆ポリフェノール（Cacao bean polyphenols、CBPs）を摂取することで血管が拡張され、血圧が低下することが動物実験だけでなく、ヒト臨床試験でも確認されている[2,3]。また、脂質異常症や耐糖能が改善することが報告され、多くの観察研究により動脈硬化の抑制や虚血性心疾患、脳卒中の発症を予防することが明らかとなってきた[4,5]。今回我々は基礎研究で、CBPsが心不全に対して改善効果があることを見出した。本日は我々の知見を中心に、CBPsの心血管系疾患に対する効能について概説する。

2．心不全パンデミックの到来

加齢とともに心不全の罹患率が急増することから、わが国では、超高齢社会の到来とともに心不全患者が溢れかえる「心不全パンデミック」が到来すると考えられている。心不全は増加しつつある虚血性心疾患、高血圧性心疾患の最終像であり、その管理は患者の予後に極めて重大な影響を及ぼす。慢性心不全の薬物療法は、強心剤・利尿剤、血管拡張剤に始まり、20世紀の終わりには神経体液性因子を標的とした心不全薬物療法が確立した。即ち、生体において心筋梗塞などのストレスが心臓にかかると、交感神経系やレニン-アンジオテンシン系の神経体液因子が作動し、心不全の進行、増悪に関与することが明らかとなり、これらを標的とした薬物：β遮断薬、ACE（アンジオテンシン変換酵素）阻害薬やARB（アンジオテンシンII受容体拮抗薬）などが慢性心不全治療薬として普遍的に用いられるようになった。これらの細胞表面受容体をブロックする薬物による治療で予後は改善するものの、重症心不全患者の5年生存率は依然50％を下回っており、ガンよりも予後の悪い疾患となっている（表1）[6,7]。

表1　心不全の予後は不良である[6,7]

生存率（%）

	5年	10年
心不全	54.1	26.7
悪性新生物	63.5	58.5
大腸がん	63.8	58.1

心不全発症とその問題点を図1に整理した。我国において、欧米式の生活スタイルすなわち、高カロリー食、過食、さらには運動不足などの生活習慣が原因で内臓脂肪が蓄積する肥満を生じる。肥満を基盤として、高血圧症、糖尿病、脂質異常症などを発症する。これらの病態がメタボリックシンドロームである。メタボリックシンドロームや喫煙がリスクファクターとなり動脈硬化を生じるが､特に心臓を栄養する血管である冠動脈の硬化はとても重要である。冠動脈硬化症に対しては、血行再建術（カテーテル治療やバイパス手術)、あるいはスタチン系薬物で治療が行われているが、動脈硬化が進行すると血管が完全閉塞する心筋梗塞を発症する。心筋梗塞を発症すると心筋組織が一部壊死することによりポンプ機能不全、すなわち心不全を発症する。高血圧自体も圧負荷が持続することにより心臓が肥大する高血圧性心疾患から慢性心不全を発症する｡慢性心不全に対しては、ACE阻害薬や、ARB、β遮断薬などで治療が行われているが、やがて末期の心不全から死に至る。末期心不全に対しては心臓移植が行われているが、ドナー不足から治療としては確立しているとは言えず、再生療法もまだまだ臨床への応用は難しい状況である。そこで、心不全の進展・増悪を抑制する新たな治療法の開発が待たれている。

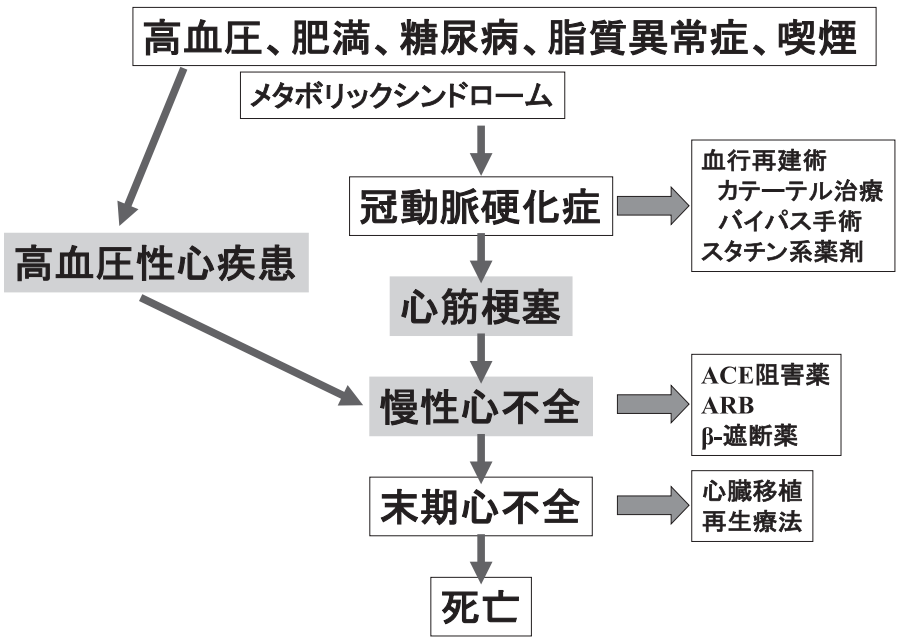

図1　心不全の発症には生活習慣病が関与する

3．カカオ豆ポリフェノールと循環器疾患

カカオ豆は多くのポリフェノールを豊富に含んでいる[8]。これらの成分の中で最も多く含まれている (−)-epicatechinはポリフェノール類のうち、フラバノール類に分類される。そして、(−)-epicatechinが二量体や三量体を形成したものがprocyanidin B2やprocyanidin C1と呼ばれる。このようにカカオ豆は単量体の (−)-epicatechinやcatechinおよび重合体のprocyanidin類など様々な種類のポリフェノールを含有している[9]。CBPsは酸化ストレスや炎症反応、代謝異常に対して保護的に作用すると考えられている[10, 11]。

CBPsの作用を図2にまとめた[12, 13]。①血圧低下作用[2, 3]、②脂質低下作用[14]、③耐糖能改善作用[4]などが報告されており、心血管疾患のリスクファクターである高血圧、脂質異常症、糖尿病に対する効果が期待されている。これらを基盤として発症する動脈硬化を抑制し[14]、さらには虚血性心疾患や脳卒中のリスクが低下することも明らかとなっている[4, 5]。さらには、④抗酸化作用、⑤内皮機能改善効果、⑥血小板機能改善効果[12, 13]などを持ちあわせていることから、急性心筋梗塞の発症抑制効果も期待できる。CBPsのメタボリック症候群の改善効果や心筋梗塞抑制効果が明かとなってきており、図1に示した心不全の発症に関与する病態を改善することから、CBPsには心不全発症予防効果が期待される。しかしながら、心不全発症後に効果があるかは検討されていない。そこで今回我々はCBPsを用いた心不全治療ができないかを培養細胞と動物モデルを用いて検討を行った。

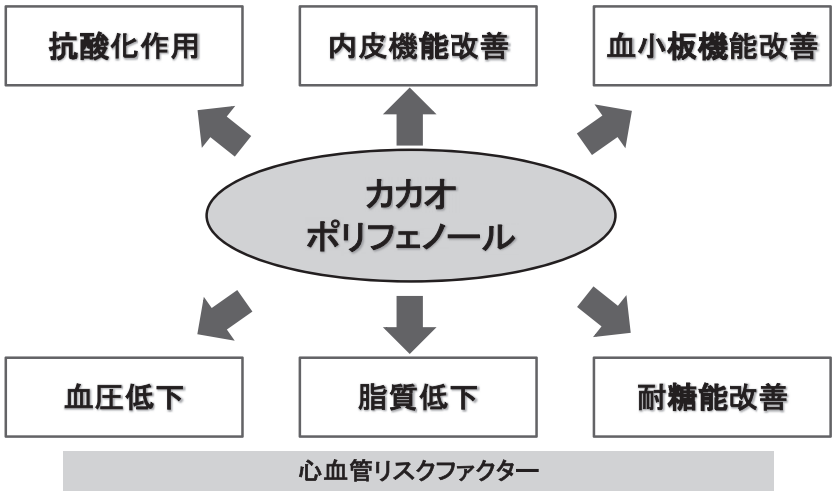

図2　カカオポリフェノールの作用[12,13]

４．心不全に対するCBPsの効果検討

本実験で用いたCBPsは株式会社 明治からの提供による。CBPsの構成成分は (−)-epicatechin（16.6%）、procyanidin B2（9.4%）、procyanidin C1（5.1%）、cinnnamtannin A2（2.3%）、procyanidin B5（1.3%）、(+)-catechin（0.8%）及びその他ポリフェノールである[15, 16]。

①CBPsはPEによる心筋細胞肥大反応を抑制した。

心筋細胞肥大に対するCBPsの効果を新生仔ラット初代培養心筋細胞を用いて検討した。CBPsで前処理を行った新生仔ラット初代培養心筋細胞に対してPEによる心筋細胞肥大刺激を行った。anti-α-actinin抗体を用いて蛍光免疫染色を行い、心筋細胞の面積を測定したところ30μMのCBPsは、PE刺激による心筋細胞肥大を有意に抑制した。さらに、心肥大マーカー遺伝子（ANF, BNP）の発現量についてqRT-PCRを用いて検討した。PEにより増加したANF及びBNPのmRNA量はCBPs処理により有意に抑制された。

CBPsはPE刺激による心筋細胞肥大を抑制したことから、PE刺激によるシグナル伝達経路を阻

害している可能性が示唆された。すでに我々は心筋細胞肥大にはERK-GATA4経路が重要な役割を果たすことを見出している[17]。そこでERK-GATA4経路に対するCBPsの効果を検討した。PEによりERK1/2のリン酸化は増加するが、この増加をCBPsは抑制した。さらに、GATA4のリン酸化を検討した。PEによるGATA4のリン酸化の増加をCBPsは抑制した。

②CBPsは圧負荷心不全モデルマウスの心機能低下を抑制した。

培養細胞レベルで効果を確認できたことから、次に圧負荷による心不全モデルマウスを用いて、生体でのCBPsの効果を検討した。C57BL/6j雄性マウスに大動脈縮窄術（TAC (Transverse Aortic Constriction) 手術）もしくはSham手術を施し、CBPsの連日経口投与を行った。手術翌日に、マウスを無作為に１）sham + vehicle群、２）TAC + vehicle群、３）TAC+CBPs 600mg/kg/day（CBPs低用量）群、そして４）TAC+CBPs 1200mg/kg/day（CBPs高用量）群の4群に割り付けた。手術8週間後、心臓超音波検査により各マウスの心機能を評価した。TAC手術によって左室後壁厚（LVPWT）は増加し、収縮能の指標である左室内径短縮率（FS）は低下するが、CBPs高用量群でそれぞれ有意に改善した。このことから、CBPsは圧負荷による心肥大及び心機能の低下を改善することが示唆された。

さらに、各マウスから心臓を単離した後、心重量および脛骨長を測定した。TAC手術により心脛骨長比は増加するが、CBPs高用量群では有意に抑制されていた。心臓組織切片をHE染色し組織学的解析を行ったところ、TAC手術により個々の心筋細胞径は増加するが、CBPs高用量群では抑制された。心臓組織からmRNAを抽出しqRT-PCR法により肥大マーカー遺伝子であるANFや

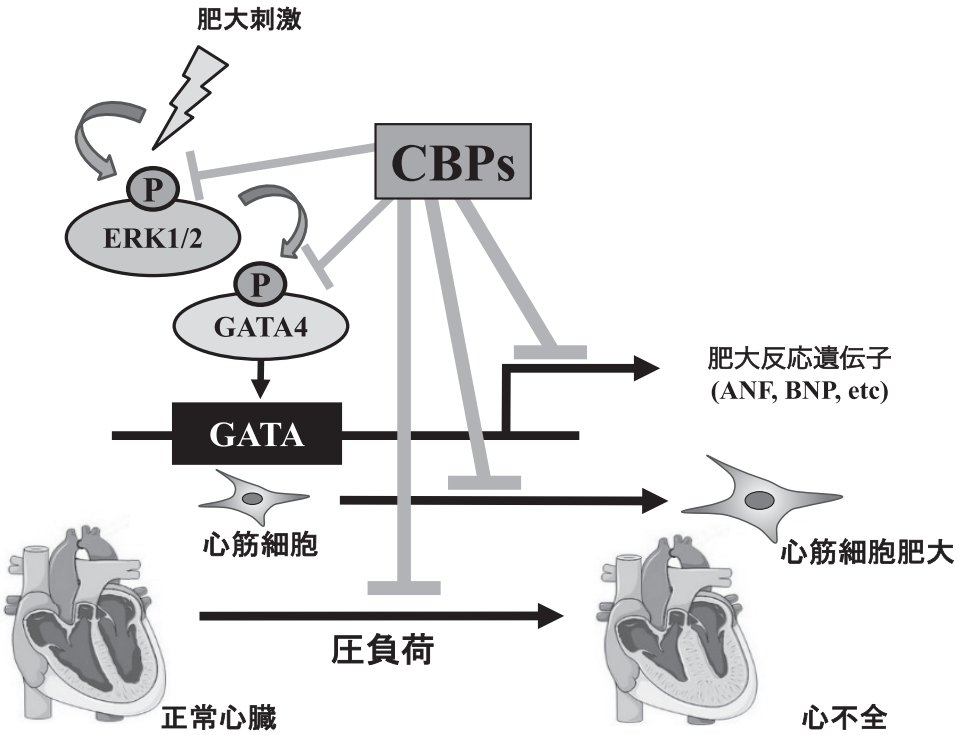

図3　CBPsが心不全治療薬や予防薬となる可能性が示唆された

BNP、β-MHCのmRNAレベルを評価した結果、CBPs高用量群ではTAC手術によって増加したANF及びBNP、β-MHCのmRNAレベルが抑制されていた。最後にCBPsの心不全進行抑制作用のメカニズムを検討するためにERK1/2のリン酸化をウェスタンブロット法で評価したところ、TAC手術によるERK1/2のリン酸化の増加はCBPs高用量投与により抑制された。また、体重減少や肝障害、腎障害などの副作用は見られなかった。

以上の結果から、CBPsが心筋細胞に対して直接作用し、ERK-GATA4経路を阻害することにより、心筋細胞肥大が抑制し、圧負荷心不全モデルマウスの心機能低下を改善することを見出した（**図3**）。今後、ヒトを対象とした臨床試験を行うことで、CBPsを用いた心不全治療・予防効果が明らかになると考える。

5．まとめ

CBPsによる心不全改善効果を認めた。本稿で取り上げた疾患以外にも、CBPsを用いた様々な臨床試験が国内外で進行中であるが、CBPsに起因する重篤な副作用についての報告はない。古くから人々に親しまれ、美味しく、安全性の確認されているカカオを摂取することで、メタボリックシンドロームなど生活習慣病が改善・予防するだけでなく、心不全治療に用いることができれば、人類への貢献は極めて大きい。

利益相反

本研究は株式会社 明治より共同研究費を受けて行った。

REFERENCES

1）Savarese G, Lund LH. Global Public Health Burden of Heart Failure. *Card Fail Rev.* 2017 ; 3 (1) : 7-11.

2）Taubert D, Roesen R, Schömig E. Effect of cocoa and tea intake on blood pressure: a meta-analysis. *Arch Intern Med.* 2007 ; 167 (7) : 626-34

3）Grassi D, Lippi C, Necozione S, Desideri G, Ferri C. Short-term administration of dark chocolate is followed by a significant increase in insulin sensitivity and a decrease in blood pressure in healthy persons. *Am J Clin Nutr.* 2005 ; 81 (3) : 611-4.

4）Yuan S, Li X, Jin Y, Lu J. Chocolate Consumption and Risk of Coronary Heart Disease, Stroke, and Diabetes: A Meta-Analysis of Prospective Studies. *Nutrients.* 2017 ; 9 (7) . pii: E688

5）Kwok CS, Boekholdt SM, Lentjes MA, Loke YK, Luben RN, Yeong JK, Wareham NJ, Myint PK, Khaw KT. Habitual chocolate consumption and risk of cardiovascular disease among healthy men and women. *Heart.* 2015 ; 101 (16) : 1279-87

6）Taylor CJ, Roalfe AK, Iles R, Hobbs FD. Ten-year prognosis of heart failure in the community: follow-up data from the Echocardiographic Heart of England Screening (ECHOES) study. *Eur J Heart Fail.* 2012 ; 14 : 176-84

7）Surveillance, Epidemiology, and End Results (SEER) Program https://seer.cancer.gov/

8）Corti R, Flammer AJ, Hollenberg NK, Lüscher TF. Cocoa and cardiovascular health. *Circulation.* 2009 ; 119 : 1433-41

9) Rimbach G, Melchin M, Moehring J, Wagner A, Rimbach G, Melchin M, Moehring J, Wagner AE. Polyphenols from Cocoa and Vascular Health–A Critical Review. *Int J Mol Sci.* 2009 ; 10 : 4290-309.
10) Natsume M. Polyphenols : Inflammation. *Curr Pharm Des.* 2018 ; 24 : 191–202.
11) Wickramasuriya AM, Dunwell JM. Cacao biotechnology : current status and future prospects. *Plant Biotechnol J.* 2018 ; 16 : 4–17.
12) Loffredo L, Perri L, Nocella C, Violi F. Antioxidant and antiplatelet activity by polyphenol-rich nutrients: focus on extra virgin olive oil and cocoa. *Br J Clin Pharmacol.* 2017 ; 83 (1) : 96-102.
13) Mellor DD, Sathyapalan T, Kilpatrick ES, Atkin SL. Diabetes and chocolate: friend or foe? *J. Agric. Food Chem.* 2015 ; 63 : 9910-8
14) Baba S, Natsume M, Yasuda A, Nakamura Y, Tamura T, Osakabe N, Kanegae M, Kondo K. Plasma LDL and HDL cholesterol and oxidized LDL concentrations are altered in normo- and hypercholesterolemic humans after intake of different levels of cocoa powder. *J Nutr.* 2007 ; 137 (6) : 1436-41.
15) Zempo H, Suzuki J, Watanabe R, Wakayama K, Kumagai H, Ikeda Y, Akazawa H, Komuro I, Isobe M. Cacao polyphenols ameliorate autoimmune myocarditis in mice. *Hypertens Res.* 2016 ; 39 : 203-9.
16) Natsume M, Osakabe N, Yamagishi M, Takizawa T, Nakamura T, Miyatake H, Hatano T, Yoshida T. Analyses of polyphenols in cacao liquor, cocoa, and chocolate by normal-phase and reversed-phase HPLC. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2000 ; 64 : 2581-7.
17) Morimoto T, Hasegawa K, Kaburagi S, Kakita T, Wada H, Yanazume T, Sasayama S. Phosphorylation of GATA-4 is involved in alpha 1-adrenergic agonist-responsive transcription of the endothelin-1 gene in cardiac myocytes. *J Biol Chem.* 2000 ; 275 : 13721-6.