

# 生活習慣病時における血管内皮由来因子シグナル障害に対する ポリフェノールの効果

松本 貴之  
星薬科大学薬学部 助教

## 緒 言

食品に含まれるポリフェノールは、抗酸化作用を始め、様々な作用を持ち、動脈硬化・癌・アレルギー等の種々の疾病予防に効果があるというエビデンスが構築されつつある。我が国で古くから愛飲されている緑茶には、ポリフェノール的一种である茶カテキンが多く含まれ、中でもエピガロカテキンガレート [epigallocatechin gallate (EGCG)] が茶類で最も多いカテキンで、強い抗酸化作用が知られている。EGCG は、抗糖尿病作用、コレステロール・中性脂肪低下作用などが知られ、また、心血管系において、血圧降下作用、抗炎症作用などが報告されている<sup>1,2)</sup>。

糖尿病は近年、世界中で増加しており、高脂血症、高血圧、肥満と共に生活習慣病の一角をなす临床上最も注目される疾患の一つとなっている。糖尿病の罹患が長期に及ぶと、糖尿病性血管合併症が発症・進展し、患者の quality of life を著しく低下させる。糖尿病性血管障害は、主に、動脈硬化性病変を特徴とする大血管症（脳・心・末梢血管系の動脈硬化症）と細小血管障害（網膜症・腎症・神経障害）に大別されるが、共に血管内皮細胞の機能障害が初期に認められ、血管病の発症・進展に血管内皮細胞の機能変化が大きく関与している<sup>3,4)</sup>。

糖尿病は、1型糖尿病と、2型糖尿病に大別されるが、本邦では2型糖尿病の患者が約95%と圧倒的に多く、その最終的障害（糖尿病性合併症）は1型糖尿病、2型糖尿病に共通の障害として全身性に現れる。この合併症は血管障害から始まると言っても過言ではないが、詳細な機序は十分には解明されていないのが現状である。2型糖尿病は、複雑な要因によってインスリン分泌低下や感受性低下を原因とする糖尿病であり、その長期的罹患は、血管機能障害を惹起し、合併症へと進展する<sup>4)</sup>。モデル動物においては、古くから1型糖尿病モデルにおけるエビデンスが構築されてきたが、2型糖尿病モデルにおけるエビデンスは近年になって蓄積されつつあり、

様々なステージにおける血管機能障害の成因・メカニズムの解明等、未だ課題が集積されている。

血管内皮細胞由来因子は血管緊張性調節に重要な役割を果たしており、弛緩因子・収縮因子が存在する。弛緩因子は、一酸化窒素 (nitric oxide; NO)、プロスタサイクリン、内皮由来過分極因子があり、大血管における弛緩因子は主として、NO が担っており、糖尿病時においては、NO バイオアベイラビリティーの低下が生じていることが報告されている<sup>3,4)</sup>。一方、収縮因子はアラキドン酸代謝物、エンドセリン-1 (ET-1) などがあり、これらの因子のバランスによって血管緊張性が調節されている。しかしながら、糖尿病病態時におけるこれらの因子によるシグナルに対するEGCGの影響についての報告は少ない。

本研究では、2型糖尿病を長期的に罹患した状態において、EGCGの長期間投与が血管機能に有益な効果を持つかどうかを調べることを目的に、2型糖尿病モデル動物である Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF) ラット (43週齢) に対しEGCGを2ヶ月間投与したモデルを作成し、胸部大動脈、総頸動脈を用いて血管反応性の検討を行った。

## 実験方法

### 1. 実験動物

実験には、雄性2型糖尿病動物 (OLETF ラット) と同週齢の対照動物 (LETO ラット) を用いた。動物実験は、星薬科大学動物実験規定に基づき、動物愛護に配慮して行った。43週齢のOLETFラット及びLETOラットをランダムに4群に分け、EGCG (200 mg/kg/day, p.o., for 2 months) 投与群 (OLETF/EGCG、LETO/EGCG 群) と非投与群 (OLETF、LETO 群) にて検討を行った。

## 2. 各種パラメータ測定

血中パラメータ (plasma cholesterol, HDL, triglyceride, insulin, NEFA) は、各種市販キットを用いて測定した。血圧は tail-cuff 法 (BP-98A; Softron, Tokyo, Japan) を用いて測定した。血中グルコースは、動脈摘出前に麻酔下で、尾静脈より血糖測定器 (OneTouch Ultra, LifeScan, a Johnson & Johnson Company, Milpitas, CA, USA) を用いて測定した。

## 3. 胸部大動脈、総頸動脈における血管反応の測定

ラットより摘出した胸部大動脈及び総頸動脈は、顕微鏡下で脂肪組織・結合組織を剥離した後、長さ2 mmのリング標本とした。標本は 95% O<sub>2</sub> + 5% CO<sub>2</sub>の混合ガスを通し 37°Cに保温した Krebs-Henseleit Solution 中に懸垂し、22 mN (胸部大動脈) 及び9.8 mN (総頸動脈) の静止張力をかけて等尺性に反応を記録した。ET-1 (10<sup>-10</sup>–10<sup>-7</sup> M)、PE (10<sup>-10</sup>–10<sup>-4</sup> M) による収縮反応、ACh (10<sup>-9</sup>–10<sup>-5</sup> M) による内皮依存性弛緩反応、SNP (10<sup>-10</sup>–10<sup>-5</sup> M) による内皮非依存性弛緩反応を観察した。弛緩反応は、PE (10<sup>-6</sup> M) で前収縮した後に、累積投与を行い検討した。内皮除去標本は、胸部大動脈に対しては、内腔をgently rubbingすることにより剥離し、総頸動脈に対しては、3- [(3-cholamidopropyl) dimethylammonio] -1-propanesulfonate solution (CHAPS, 0.1%, for 60 s) でinfusionして作成した。内皮除去標本の確認は、PE (10<sup>-6</sup> M) で前収縮した後、

ACh (10<sup>-5</sup> M) 投与で弛緩反応が消失することで確認した。

## 4. Western blotting法による蛋白発現の検討

各動脈における蛋白発現は、western blotting 法を用いて検討した。胸部大動脈、総頸動脈を摘出し、脂肪組織や結合組織を除き、液体窒素を用いて凍らせ、-80°Cで保存した。その後、常法<sup>5)</sup>にて、ET<sub>A</sub> receptor、ET<sub>B</sub> receptor、eNOS並びにβ-actinの蛋白発現を検討した。

## 5. 統計

データは means ± SEM で表示し、統計学的検討には analysis of variance (one-way or two way ANOVA with a post-hoc Bonferroni) を用いた。P<0.05 を統計的有意とした。

## 結 果

### 1. 各種パラメータの検討

Table 1 に示すとおり、LETO ラットと比較し、OLETF ラットにおいて、glucose、total cholesterol、triglyceride、HDL、NEFA 並びに収縮期血圧が有意に増加していた (Table 1)。LETO 群と比較して LETO/EGCG 群において、体重、血圧の有意な低下が認められた。OLETF 群と比較して、OLETF/EGCG 群において、triglyceride の有意な低下が認められた。

Table 1 Various parameters of four experimental groups

Parameters	LETO	LETO/EGCG	OLETF	OLETF/EGCG
BW (g)	550.3±7.2 (17)	489.0±5.8 (17) **	553.6±16.1 (17)	538.8±13.9 (17)
SBP (mmHg)	126±2 (17)	108±3 (17) ***	154±2 (17) ***	146±4 (17) ***
Glucose (mg/dl)	118.9±1.8 (17)	119.1±3.9 (17)	471.6±22.7 (17) ***	439.1±28.1 (17) ***
Insulin (ng/ml)	2.52±0.2 (16)	1.87±0.1 (17)	1.79±0.4 (16)	1.32±0.1 (17)
Cholesterol (mg/dl)	102.2±4.1 (17)	87.0±2.6 (17)	129.0±7.0 (17) **	130.0±5.1 (17) **
Triglyceride (mg/dl)	98.2±9.1 (17)	81.3±7.2 (17)	495.9±59.3 (17) ***	340.1±30.2 (17) ***,#
HDL (mg/dl)	65.4±2.4 (17)	70.7±2.2 (17)	97.6±6.0 (17) ***	96.9±4.2 (17) ***
NEFA (mEq/l)	0.48±0.03 (17)	0.42±0.02 (17)	0.82±0.07 (17) ***	0.67±0.04 (17) *

BW, body weight; SBP, systolic blood pressure; HDL, high-density lipoprotein; NEFA, nonesterified fatty acid; LETO, Long-Evans Tokushima Otsuka; OLETF, Otsuka Long-Evans Tokushima fatty; EGCG, epigallocatechin gallate. Values are means±SEM. Number of determinations within parentheses. \*P<0.05, \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001 vs. LETO. #P<0.05 vs. OLETF.

## 2. ET-1による収縮反応の検討

OLETF群と比較して、胸部大動脈、総頸動脈いずれにおいてもOLETF/EGCG群でET-1による収縮反応曲線が右にシフトしていた (Figure 1A & 1C) [胸部大動脈  $pD_2$ :  $8.24 \pm 0.06$ ,  $n=10$  (OLETF) vs.  $7.98 \pm 0.08$ ,  $n=10$  (OLETF/EGCG),  $p<0.05$ ; 総頸動脈  $pD_2$ :  $8.15 \pm 0.06$ ,  $n=10$  (OLETF) vs.  $7.95 \pm 0.07$ ,  $n=10$  (OLETF/EGCG),  $p<0.05$ ]。また、LETO群と比較して、胸部大動脈においてLETO/EGCG群でET-1による収縮反応曲線が右にシフトしていた (Figure 2A) が、総頸動脈では変化が認められなかった (Figure 2C) [胸部大動脈  $pD_2$ :  $8.42 \pm 0.07$ ,  $n=10$  (LETO) vs.  $8.19 \pm 0.06$ ,  $n=10$  (LETO/EGCG),  $p<0.05$ ; 総頸動脈  $pD_2$ :  $8.21 \pm 0.05$ ,  $n=10$  (LETO) vs.  $8.18 \pm 0.09$ ,  $n=10$  (LETO/EGCG)]。内皮除去標本においては、OLETFとOLETF/EGCG間の胸部大動脈 (Figure 1B)、総頸動脈 (Figure 1D)、LETOとLETO/EGCG間の胸部大動脈 (Figure 2B)、総頸動脈 (Figure 2D) でET-1収縮に変化が認められなかった。また、 $\alpha_1$ アゴニストであるPE収縮において、胸部大動脈、総頸動脈共にOLETF

群とOLETF/EGCG間に変化が認められなかった。一方、LETO群と比較してLETO/EGCG群にて胸部大動脈でPE収縮の減弱が認められたが、総頸動脈では変化が認められなかった (data not shown)。

## 3. 内皮依存性弛緩反応の検討

次に、胸部大動脈、総頸動脈における、ACh誘発内皮依存性弛緩反応並びに、SNP誘発内皮非依存性弛緩反応について検討を行った (Figure 3)。AChによる内皮依存性弛緩反応において、OLETF群と、OLETF/EGCG群とを比較して、胸部大動脈 (Figure 3A)、総頸動脈 (Figure 3C) いずれにおいても、EGCG投与群で、弛緩反応の増強が認められた。一方、SNPによる内皮非依存性弛緩反応は、胸部大動脈 (Figure 3B) 及び総頸動脈 (Figure 3D) において、OLETF、OLETF/EGCG間で変化が認められなかった。

## 4. 胸部大動脈におけるET receptors及びeNOSタンパク発現の検討

Figure 4に示す通り、胸部大動脈におけるET<sub>A</sub>受

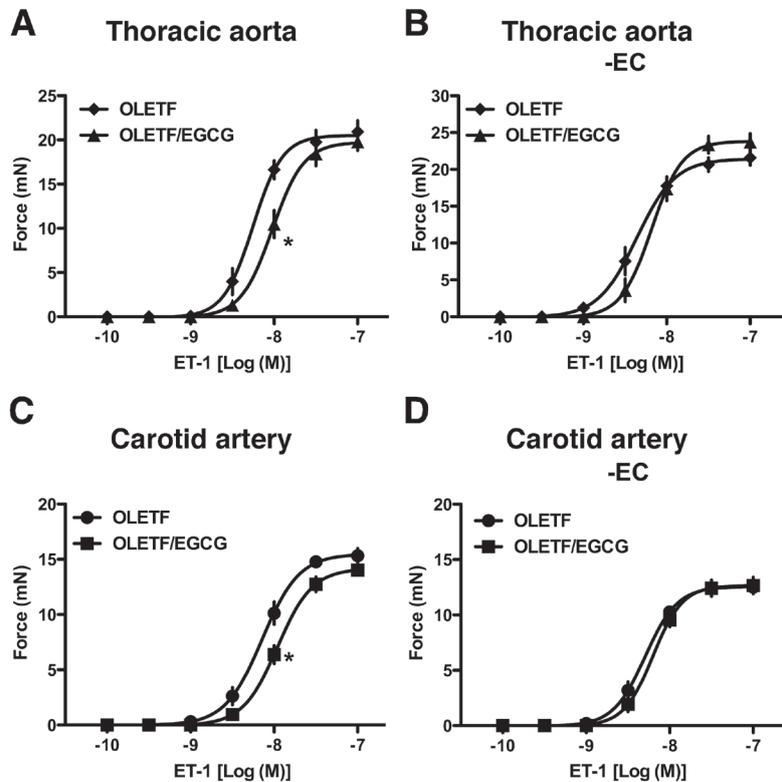


Figure 1 OLETF ラット及び OLETF/EGCG ラット摘出胸部大動脈及び総頸動脈における ET-1 収縮反応と内皮除去 (-EC) の影響

(各群  $n=10$ ) \* $P<0.05$  vs. OLETF group.

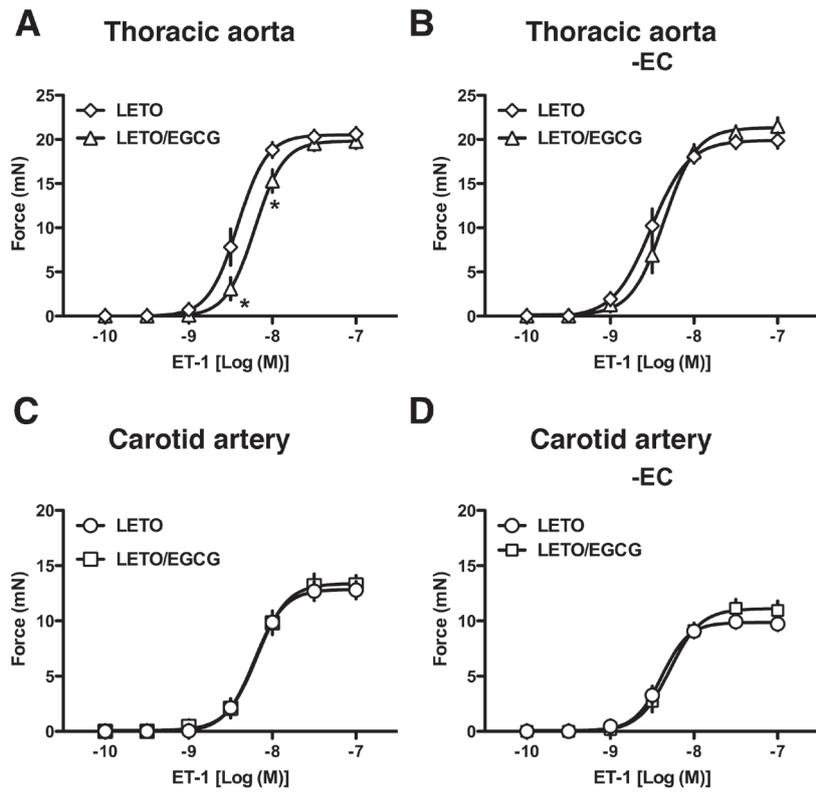


Figure 2 LETO ラットおよび LETO/EGCG ラット摘出胸部大動脈及び総頸動脈における ET-1 収縮反応と内皮除去 (-EC) の影響 (各群 n=10) \*P<0.05 vs. LETO group.

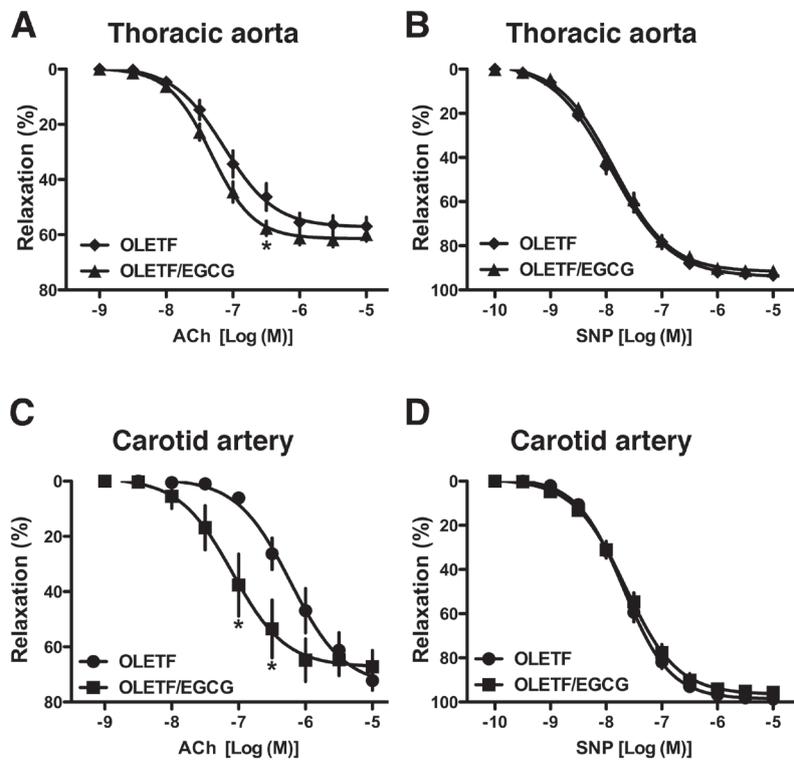


Figure 3 OLETF ラット及び OLETF/EGCG ラット摘出胸部大動脈及び総頸動脈における内皮依存性及び内皮非依存性弛緩反応の検討 (各群 n=7-10) \*P<0.05 vs. OLETF group.

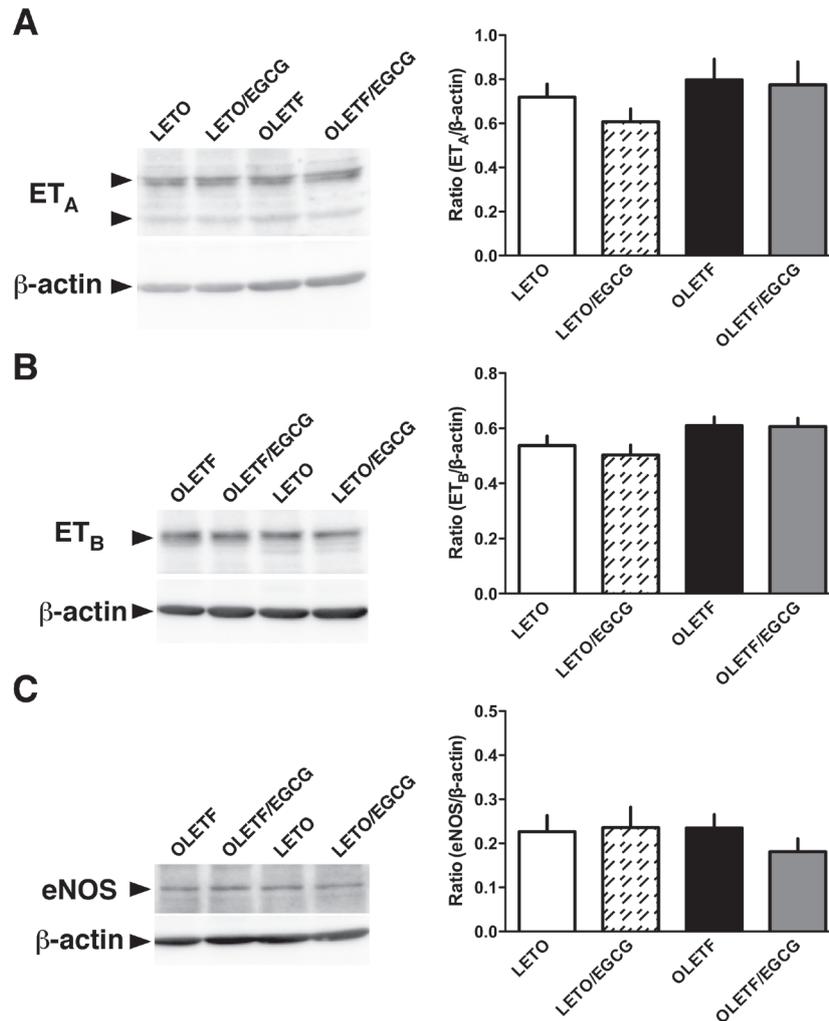


Figure 4 胸部大動脈における ET 受容体及び eNOS 蛋白発現の検討 (各群 n=7,8)

容体 (Figure 4A)、ET<sub>B</sub> 受容体 (Figure 4B) 並びに eNOS (Figure 4C) タンパク発現は、各群で変化が認められなかった。

### 考 察

本研究によって、2 型糖尿病を長期的に罹患したモデルラットである OLETF ラットに対して、長期間 (2 ヶ月間) EGCG を投与することにより、胸部大動脈や総頸動脈において ET-1 による収縮反応の抑制並びに、内皮依存性弛緩反応の改善が認められた。

ET-1 は、強力な血管収縮ペプチドであり、その反応性は、糖尿病を含む様々な生活習慣病で異常が報告されている<sup>6)</sup>。また、NO は、大血管における主要な内皮由来弛緩因子であり、ET-1 の収縮反応に拮抗的に働くことも知られている<sup>5)</sup>。本研究においては、OLETF ラッ

トの胸部大動脈及び総頸動脈、また、LETO ラットの胸部大動脈において、EGCG 投与により ET-1 の収縮反応が抑制された。また、これらの反応の差は、内皮除去標本において消失した。OLETF ラットの胸部大動脈・総頸動脈において、EGCG 投与により、内皮依存性弛緩反応が是正された。また、胸部大動脈における ET-1 受容体 (ET<sub>A</sub> 及び ET<sub>B</sub> 受容体) 発現は、EGCG 投与で影響が認められなかった。これらの結果より、EGCG による ET-1 収縮抑制効果は、受容体変化ではなく、内皮機能障害の是正に起因することが示唆された。OLETF ラットにおいて、EGCG 慢性投与により、glucose、insulin、cholesterol、HDL 値には影響しなかったが、NEFA の低下傾向、triglyceride の低下が認められた。NEFA や、triglyceride は、内皮機能障害との関連性が報告されているため<sup>7,8)</sup>、EGCG の内皮機能障害の是正

に一部関与している可能性が示唆された。

本研究においては、OLETF ラットにおいては、EGCG 投与による血圧低下は認められなかったものの、LETO ラットにおいては、EGCG 投与によって血圧低下が認められた。この機序についての詳細は、血圧調節に関与する抵抗血管における反応性の検討など、今後の検討課題である。

## 要 約

本研究により、2 型糖尿病を長期罹患したモデル動物において、EGCG を慢性投与することによって、胸部大動脈や総頸動脈といった大血管において ET-1 による収縮反応が抑制されること、内皮依存性弛緩反応が是正されることが明らかとなった。EGCG の投与によって、動脈における ET<sub>A</sub> や、ET<sub>B</sub> receptor の発現抑制ではなく、内皮機能改善が ET-1 収縮抑制に繋がったと考えられる。生活習慣病時における血管機能障害に対する EGCG の効果・メカニズムの更なる検討が待たれるところである。

## 謝 辞

本研究を遂行するにあたって、公益財団法人三島海雲記念財団による研究助成を賜りましたことを深く感謝申し上げますと共に、ご助力いただきました、星薬科大学機能形態学研究室の小林恒雄教授、ならびに研究室のメンバーに深く感謝致します。なお、本研究報告書の内容は、現在、投稿準備中であることを申し添えます。

## 文 献

- 1) Babu, P.V., Liu, D.: *Curr Med Chem.* 15, 1840-1850, 2008.
- 2) Sae-tan, S., et al, : *Pharmacol Res.* 64, 146-154, 2011.
- 3) Kobayashi, T., et al, : *J Smooth Muscle Res.* 8, J49-J63, 2004.
- 4) Forbes, J.M., Cooper, M.E.: *Physiol Rev.* 93, 137-188, 2013.
- 5) Matsumoto, T., et al, : *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 296, H1388-H1397, 2009.
- 6) Pernow, J., et al, : *Life Sci.* 91, 507-516, 2012.
- 7) Yasu, T., et al, : *Clin Sci.* 125, 247-255, 2013.
- 8) Soku, A., et al, : *Acta Obstet Gynecol Scand.* 91, 182-188, 2012.