

リンゴポリフェノールの抗老化機能および  
その抗老化機能の食品開発への展開

Anti-Aging Effects of Apple Polyphenols and  
Their Application to Development of  
Functional Foods for Anti-Aging

2016 年 2 月

砂川 忠広

Tadahiro SUNAGAWA

リンゴポリフェノールの抗老化機能および  
その抗老化機能の食品開発への展開

Anti-Aging Effects of Apple Polyphenols and  
Their Application to Development of  
Functional Foods for Anti-Aging

2016 年 2 月

早稲田大学大学院 先進理工学研究科

砂川 忠広

Tadahiro SUNAGAWA

## 目次

第 1 章 序論	1
1.1 酸化ストレスと老化	1
1.2 抗酸化食品成分と老化制御作用	3
1.3 リンゴポリフェノールの構造および生理機能	3
1.4 本研究の意義	5
1.5 参考文献	5
第 2 章 リンゴポリフェノールのラットにおけるコレステロール値および肝臓コレステロール代謝遺伝子発現への影響	11
2.1 緒言	11
2.2 材料および方法	11
2.3 結果	14
2.4 考察	16
2.5 要約	18
2.6 参考文献	18
第 3 章 リンゴポリフェノールのアミロイド $\beta$ タンパク質の凝集体形成および神経細胞の毒性に対する影響	30
3.1 緒言	30
3.2 材料および方法	30
3.3 結果	32
3.4 考察	33
3.5 要約	36
3.6 参考文献	37
第 4 章 リンゴポリフェノールの線虫における生存率への影響	45
4.1 緒言	45
4.2 材料および方法	45
4.3 結果	47
4.4 考察	49
4.5 要約	51
4.6 参考文献	51

第 5 章 リンゴポリフェノールの心筋特異的 Mn-SOD 欠損マウスにおける酸化ストレスおよび生存率への影響	61
5.1 緒言	61
5.2 材料および方法	62
5.3 結果	65
5.4 考察	67
5.5 要約	68
5.6 参考文献	69
第 6 章 リンゴポリフェノールの心筋特異的 Mn-SOD 欠損マウスにおける電気生理学的変化および不整脈発生率への影響	81
6.1 緒言	81
6.2 材料および方法	81
6.3 結果	85
6.4 考察	87
6.5 要約	88
6.6 参考文献	89
第 7 章 リンゴポリフェノール抗老化機能の総括および抗老化機能食品開発への展開	101
7.1 リンゴポリフェノールの抗老化機能の総括	101
7.2 抗老化機能食品の開発戦略	106
7.3 抗老化機能食品の商品化	107
7.4 結言	108
7.5 参考文献	109
第 8 章 結論	117
8.1 各章の総括	117
8.2 今後の展望	118
8.3 参考文献	118
研究業績	120
謝辞	123

# 第 1 章

## 序論

### 1.1 酸化ストレスと老化

酸化ストレスの原因となる分子種には、フリーラジカル(free radical)および活性酸素種(reactive oxygen species, ROS)がある<sup>(1,2)</sup>。Halliwell らは、フリーラジカルについて以下のように説明している<sup>(3)</sup>。「フリーラジカルは、一個以上の不対電子を有する原子もしくは分子である<sup>(3)</sup>。フリーラジカルではない分子では、電子は原子核の周りを動き、対をなして安定であるが、フリーラジカル分子では、不対電子が他の分子から電子を 1 個奪い対になろうとするため不安定で化学反応性が増大する<sup>(3)</sup>。水素ラジカル  $\text{H}^\bullet$  (元素記号のドット“ $\bullet$ ”は、フリーラジカルの不対電子を示す)は陽子および電子を 1 個ずつ有する最も単純なフリーラジカルであり、フリーラジカルの連鎖反応は他の分子から  $\text{H}^\bullet$  を除去することから開始することが多い<sup>(3)</sup>。」

一方、吉川らは、ROS を以下のように説明している<sup>(4)</sup>。「ROS は、活性の高い酸素種の総称であり、フリーラジカルと非ラジカル種に分類される<sup>(4)</sup>。フリーラジカルに分類されるものは、通常の酸素分子である三重項酸素( $^3\text{O}_2$ )、スーパーオキシドラジカルアニオン(スーパーオキシド、 $\text{O}_2^{\bullet-}$ )、ヒドロキシルラジカル( $\text{HO}^\bullet$ )、脂質ペルオキシラジカル( $\text{LOO}^\bullet$ )、アルコキシラジカル( $\text{LO}^\bullet$ )、一酸化窒素( $\text{NO}^\bullet$ )が挙げられる<sup>(4)</sup>。非ラジカル種では、過酸化水素( $\text{H}_2\text{O}_2$ )、一重項酸素( $^1\text{O}_2$ )、ペルオキシナイトライト( $\text{ONOO}^-$ )、脂質ヒドロペルオキシド( $\text{LOOH}$ )、次亜塩素酸( $\text{HOCl}$ )、オゾン( $\text{O}_3$ )などである<sup>(4)</sup>。」

ROS のうち、フリーラジカル的一种であるスーパーオキシドの生体内での生成機構について、Chance らは以下のように述べている<sup>(5)</sup>。「スーパーオキシドは、生体内で細胞ミトコンドリアの電子伝達系等において、分子が酸素と反応する際に避けることが出来ず副次的に生じる産物である<sup>(5)</sup>。細胞ミトコンドリアでの電子伝達系反応、ROS 産生、および抗酸化酵素反応について、Fig. 1.1 に示す。ミトコンドリア内膜では電子の伝達と共役して、水素イオンが膜間腔に汲み出され、ATP が産生される<sup>(5)</sup>。呼吸により取り入れた酸素分子の多くは、複合体 IV で伝達された電子によって四電子還元され、水が生成される<sup>(5)</sup>。しかし酸素分子全てが水にはならず、一部は内膜の電子により一電子還元され、スーパーオキシドが生成する<sup>(5)</sup>。」

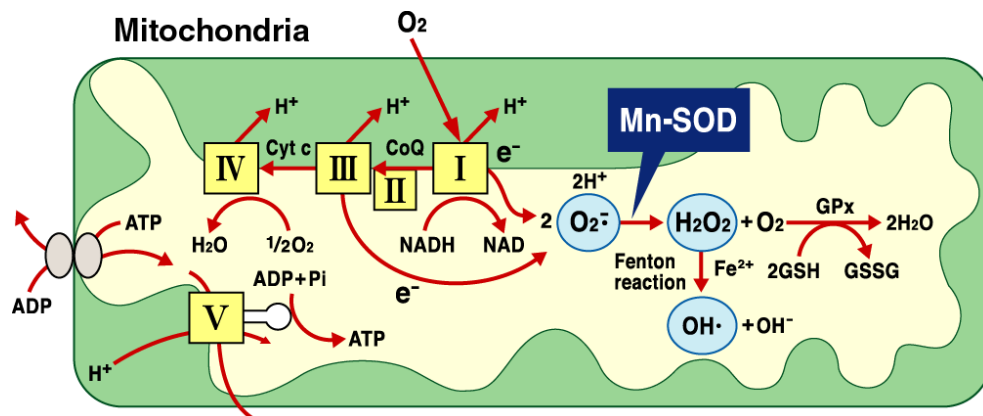


Fig. 1.1 ミトコンドリアでの電子伝達系におけるスーパーオキシド産生と抗酸化酵素 Mn-SOD

吉川らは、酸化ストレスとは一般的に「生体の酸化反応と抗酸化反応のバランスが崩れ、前者に傾いた状態」と定義されることを示している<sup>(4)</sup>。一方、Harman が、1956 年にフリーラジカルによる老化進行との関連性を説いて以来、酸化ストレスと老化の関連性が議論されている<sup>(6,7)</sup>。酸化ストレスは加齢にともなう生体内変化の主要な原因と考えられており、加齢にともなう生体内での ROS の増加や、組織傷害、および機能障害への ROS の関与が報告されている<sup>(1,2,8)</sup>。また、酸化傷害の蓄積が老化を加速することが報告されている<sup>(9)</sup>。DNA 中の塩基であるデオキシグアノシンが酸化をうけて生成する酸化的 DNA 損傷塩基 8-オキシ-2'-デオキシグアノシン(8-oxodG)は、生体の DNA 酸化傷害マーカーとして知られている<sup>(10)</sup>。また、DNA 中の 8-oxodG は突然変異を誘発する<sup>(11)</sup>。加齢マウスの各臓器における 8-oxodG 量を、若齢マウスと比較すると、細胞分化が終了した細胞が多い、脳、心臓、骨格筋において大きく増加することが示されている<sup>(12)</sup>。また、老齢ラットで、心臓、肝臓、腎臓において増加することが示されている<sup>(13)</sup>。さらに、老齢マウスの脳中で酸化物が増加することが報告されている<sup>(14)</sup>。酸化ストレスと疾患の関係では、心臓において加齢に伴った ROS の増加が心機能異常に関与することが示唆されている<sup>(15-17)</sup>。また、脳において神経変性疾患であるアルツハイマー病での酸化ストレスの関与が報告されている<sup>(18)</sup>。

一方、生体は ROS を消去する抗酸化機構を有している。例えば、抗酸化酵素スーパーオキシドジスムターゼ(SOD)は ROS の一種であるスーパーオキシドを過酸化水素と酸素に不均化する(Fig. 1.1)。生体には、ROS によって生じた 8-oxodG による突然変異誘発作用に対する修復機構も存在する。ヌクレオチド除去修復系酵素としては、8-oxoG DNA グリコシラーゼ(OGG1)、8-oxodGTP 消去酵素(MTH1)、および 3'-5' exonuclease (APE2) 等があげられ、酸化ストレスからの防御に重要である<sup>(10,11,19)</sup>。生体内の酸化ストレス回避にはこれらの抗酸化酵素や修復酵素が重要な役割を担うが、過剰な酸化ストレスに曝されると生体内の抗酸化酵素だけでは処理できなくなると考えられている<sup>(20)</sup>。

## 1.2 抗酸化食品成分と老化制御作用

日本をはじめとする先進国は高齢社会を迎え、医療費が増大し、社会保障制度を持続させることが課題となっている<sup>(21)</sup>。政府は、高齢者が生活の質(QOL)を維持し、充実した生活をおくるための「健康寿命の延伸」、すなわち健康年齢と平均寿命の乖離を小さくするための施策をうちだしている。予防医学の観点から、食による老化制御効果への期待が高まっており、機能性食品研究の必要性が増大している<sup>(22)</sup>。

前項(1.1)のように、酸化ストレスと老化の関係は密接であり、抗酸化作用を有する食材摂取は有用と考えられる。食品由来の抗酸化成分としては、ビタミン類、ポリフェノール、カロテノイド、イソチオシアネート、植物ステロール等が挙げられる<sup>(23)</sup>。脂溶性ビタミンであるビタミン E は、生体内で脂質ペルオキシラジカルをはじめとするフリーラジカルと反応してラジカルを消失させることにより、自らがビタミン E ラジカル(クロモノキシラジカル)となり、フリーラジカルによる脂質の連鎖的な酸化を阻止している<sup>(24)</sup>。生成されたビタミン E ラジカルは、脂質ペルオキシラジカルをはじめとするフリーラジカルと反応することで両者のラジカルが消去される。また、残りのビタミン E ラジカルは、ビタミン C 等の抗酸化物質によりビタミン E に再生される<sup>(24)</sup>。ビタミン E によるラジカル捕捉の詳細な分子機構については、藤本らの文献が詳しい<sup>(25)</sup>。ビタミン E の摂取は、虚血性心疾患、高コレステロール、がん等の疾患に対して有効であることが報告されている<sup>(24)</sup>。また、ビタミン E の減少は、加齢にともなう酸化ストレスマーカーのひとつとして挙げられている<sup>(26)</sup>。一方、抗酸化剤の摂取は、生体内でビタミン E ラジカルからビタミン E を再生させることで、ビタミン E の抗酸化作用を上昇させることが報告されている<sup>(24)</sup>。また、抗酸化剤摂取による老化抑制の可能性についても述べられている<sup>(27)</sup>。このように抗酸化食品は、生体内で酸化ストレスに対して抗酸化作用を有し、生体内のビタミンをはじめとする抗酸化物質の再生作用を有することから、抗酸化食品は健康維持および疾病予防のための栄養補助食品として欧米を中心に広く使用されており、健康維持や QOL 向上の役割が期待されている<sup>(28)</sup>。

## 1.3 リンゴポリフェノールの構造および生理機能

抗酸化成分の一種であるポリフェノールは、多価ヒドロキシル基を有するフェノール性化合物の総称であり、ベンゼン環上にヒドロキシル基を 2 個以上もつものと定義される<sup>(29)</sup>。ポリフェノールはさらに、フラボノイド類、プロアントシアニジン(タンニン)類、スチルベナイド類、フェニルプロパノイド(フェノール酸)類等の化合物群に分類される。リンゴ(バラ科リンゴ属, *Rosaceae*, *Malus* sp.)は、

その果実にポリフェノールを含有する果物類の一種であり、世界的に最も栽培量および消費量が多い果物の一つである<sup>(30)</sup>。リンゴ果実中には、品種・産地によって異なるが、ポリフェノールは最大 0.1%(w/w)程度含まれている<sup>(31, 32)</sup>。リンゴの主要なポリフェノールはプロシアニジン類であり、(−)-エピカテキンまたは(+)-カテキンが 2 分子以上重合した構造をとる<sup>(33)</sup>。なお、プロシアニジン類とは、プロアントシアニジン類のうち酸性溶液中で加熱することによりシアニジン類を生成するものの総称である<sup>(34)</sup>。リンゴ(*Malus pumila* Mill.)の未熟果(幼果)からポリフェノール成分のみ抽出したリンゴポリフェノール(AP)は、プロシアニジン類(PC)を重量として 65%程度含んでおり、PC は重合度および結合様式が異なる複数の成分から成る<sup>(33)</sup>。Yanagida らは、サイズ排除クロマトグラフィーを用いて AP の分子量分布を明らかにした(Fig. 1.2)<sup>(35)</sup>。チャ(*Camellia sinensis*)由来のポリフェノールは、エピガロカテキンガレート(EGCG)等の単量体のみで構成されるが、AP は単量体と 2 量体以上の PC を含み、平均重合度は 4~5 量体であった(Fig. 1.2)。一方、ブドウ(*Vitis* spp.)種子由来のポリフェノールは、プロアントシアニジン類を含むが<sup>(36)</sup>、AP との分子量分布パターンは異なっており、ブドウは高分子(高重合度)体が多いのに対して、リンゴは比較的低分子(低重合度)体が多かった(Fig. 1.2)。近年、リンゴ PC の単一成分を構造解析する技術が確立されはじめ、4 量体 PC の単一成分分離と NMR 解析による構造決定がなされている<sup>(37)</sup>。また、複数のリンゴ品種由来 PC の化合物分布の相違が 2 次元 LC を用いて比較されている<sup>(38)</sup>。

果物をはじめとした植物に含まれるポリフェノールの機能性については、生体内で抗酸化作用を有することが報告されている<sup>(39-42)</sup>。AP の抗酸化活性については、抗酸化活性の指標となる SOD 様活性<sup>(43)</sup>、および酸素ラジカル吸収能(ORAC)<sup>(44)</sup>を *in vitro* で確認している<sup>(45)</sup>。AP および 2 量体プロシアニジン PB1、PB2 の SOD 様活性は、SOD 類似化合物の EUK-134 と比べて高値であった(Fig. 1.3)。また、AP、2 量体プロシアニジン PB1、PB2 の ORAC は、抗酸化ビタミンのビタミン C や、チャカテキンの EGCG と比べて高値であった(Fig. 1.3)<sup>(45)</sup>。AP は、種々の生理作用を有することが明らかとなっており、内臓脂肪蓄積抑制作用、血中コレステロール低減作用、抗アレルギー作用、抗ガン作用等が挙げられる<sup>(46-49)</sup>。また、PC の重合度とリパーゼ阻害作用に正の相関があることが明らかになっている<sup>(50)</sup>。PC は、複数のフェノール性水酸基を平面上に有するその分子構造から、タンパク質、糖質、脂質等の生体成分と相互作用しやすい性質を示す<sup>(50,51)</sup>。

一方、リンゴの栽培では、過大量の着果が翌年の着果数を低下させるため、幼果時期に間引く"摘果"を行っている<sup>(52)</sup>。摘果された幼果は主に廃棄処理されており、食品としてのリンゴとは競合せず、幼果を工業的に利用することがリンゴ消費量へ及ぼす影響は少ない。また、幼果は成熟果と比べて糖分が少なくポリフェノール含有濃度が大きいいため製造効率がよく、ポリフェノール食品素材の原料として工業的な価値を有する<sup>(51)</sup>。AP の製造にあたり、幼果から効率よく抽出精製する工業的方法が考案された<sup>(53)</sup>。この方法で製造された AP は、ヒトにおける安全性について確認され、米国 FDA の GRAS 認証を取得し、安全性の認められた食品素材として利用されている<sup>(51)</sup>。



この食品素材 AP を配合した「ポリフェノール烏龍茶」などの特定保健用食品(トクホ)商品が開発されている<sup>(54)</sup>。

## 1.4 本研究の意義

前項(1.2)で述べたように、健康寿命の延伸化の役割を担う食品の開発に期待が寄せられている。近年、ブドウ種子に含まれるポリフェノールの *trans*-レスベラトロールに高脂肪食マウスにおける寿命延長作用を示すことが報告されてから、その機能性が注目されている<sup>(55)</sup>。AP はポリフェノールの中でも *in vitro* での抗酸化活性が高値であることが知られているが、AP の生体内での抗老化作用についてはこれまで調査されていなかった。前項(1.3)で述べたように、AP は安定供給が可能な幼果汁からの製造法が確立しており、機能性食品への応用実績もあることから、抗老化機能食品への展開が期待される。

以上を背景として、本論文では AP を活用した抗老化機能食品開発への展開を目的として、*in vitro* に加え細胞および老化モデル生物を用いた *in vivo* での試験を実施し、生体内での AP の抗酸化作用や抗老化作用の有無と機能性食品への展開可能性について検証する。具体的には、第 2 章では、コレステロール負荷ラットを用いて AP の生活習慣病に対する影響について検証する。第 3 章では、老化にともない進行するアルツハイマー病の原因となるアミロイド  $\beta$  タンパク質に対する AP の影響について検証する。第 4 章では、老化モデル生物である線虫の生存率に対する AP の影響について検証する。第 5 章では、心筋特異的マンガン-SOD 欠損マウスの生存率に対する AP の影響について検証する。第 6 章では、本欠損マウスの心臓電気生理学的異常な表現型に対する AP の影響について検証する。第 7 章では、複数の試験系を用いた多面的評価により得られた抗老化機能の検証結果を総括し、その知見を活用して AP を含有する抗老化機能食品開発へ展開した取り組みについて記述する。

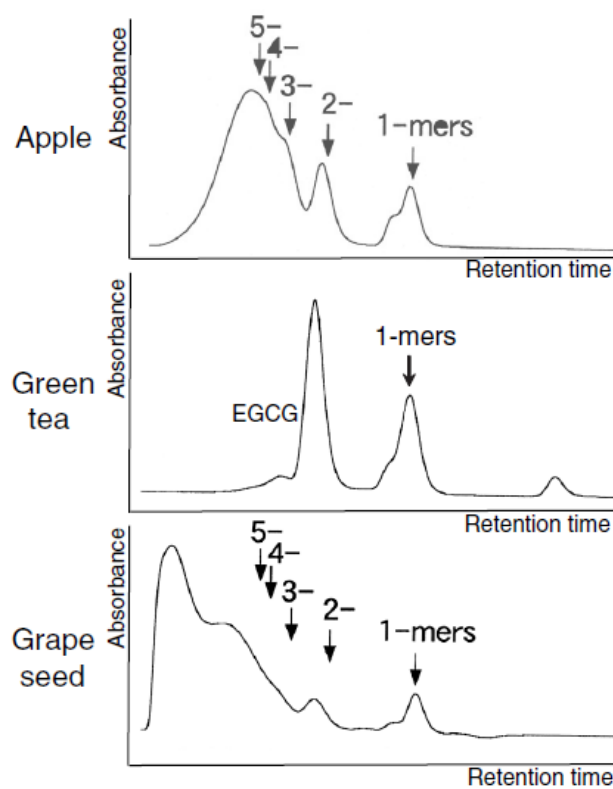
## 1.5 参考文献

1. Halliwell, B. Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause, or consequence? *Lancet*. **344**, 721-724 (1994)
2. Dröge, W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev*. **82**, 47-95 (2002)
3. Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C. *Free radicals in biology and medicine*. 2nd ed. Oxford: Clarendon Press, New York, NY, p.p. 1-20 (1989)
4. 吉川敏一, 内藤裕二. アンチエイジングとバイオマーカー, アンチエイジングと機能性食品—

- 今なぜバイオマーカーか, 吉川敏一, 大澤俊彦監修. シーエムシー出版, 東京, p.p. 8-14 (2006)
5. Chance, B., Sies, H., Boveris, A. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol Rev*. **59**, 527-605 (1979)
  6. Harman, D. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J Gerontol*. **11**, 298-300 (1956)
  7. Finkel, T., Holbrook, N.J. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature*. **408**, 239-247 (2000)
  8. Cooke, M.S., Evans, M.D., Dizdaroglu, M., Lunec, J. Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. *FASEB J*. **17**, 1195-1214 (2003)
  9. Sohal, R.S., Weindruch, R. Oxidative stress, caloric restriction, and aging. *Science*. **273**, 59-63 (1996)
  10. de Souza-Pinto, N.C., Eide, L., Hogue, B.A., Thybo, T., Stevnsner, T., Seeberg, E., Klungland, A., Bohr, V.A. Repair of 8-oxodeoxyguanosine lesions in mitochondrial DNA depends on the oxoguanine DNA glycosylase (OGG1) gene and 8-oxoguanine accumulates in the mitochondrial DNA of OGG1-defective mice. *Cancer Res*. **61**, 5378-5381 (2001)
  11. 續輝久, 早川浩, 中津可道. 酸化的損傷ヌクレオチドにより誘発される変異の防御システム, 別冊「医学のあゆみ」酸化ストレス Ver. 2 フリーラジカル医学生物学の最前線, 吉川敏一編集. 医歯薬出版, 東京, p.p. 3-7 (2006)
  12. Sohal, R.S., Agarwala, S., Candasa, M., Forsterb, M.J., H., L. Effect of age and caloric restriction on DNA oxidative damage in different tissues of C57BL/6 mice. *Mech Ageing Dev*. **76**, 215-224 (1994)
  13. Kaneko, T., Tahara, S., Matsuo, M. Retarding effect of dietary restriction on the accumulation of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in organs of fischer 344 rats during aging. *Free Radical Biol Med*. **23**, 76-81 (1997)
  14. 平松緑. 抗酸化成分と脳疾患, 老化抑制と食品. 食品総合研究所編集. アイピーシー, 東京, p.p.84-85 (2002)
  15. Lucas, D.T., Szweda, L.I. Cardiac reperfusion injury: aging, lipid peroxidation, and mitochondrial dysfunction. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **95**, 510-514 (1998)
  16. Dhalla, N.S., Temsah, R.M., Netticadan, T. Role of oxidative stress in cardiovascular diseases. *J Hypertens*. **18**, 655-673 (2000)
  17. Lakatta, E.G. Arterial and cardiac aging: major shareholders in cardiovascular disease enterprises: Part III: cellular and molecular clues to heart and arterial aging. *Circulation*. **107**, 490-497 (2003)
  18. Harman, D. Free radical theory of aging: Alzheimer's disease pathogenesis. *Age*. **18**, 97-119 (1995)
  19. Dan, Y., Ohta, Y., Tsuchimoto, D., Ohno, M., Ide, Y., Sami, M., Kanda, T., Sakumi, K., Nakabeppu, Y. Altered gene expression profiles and higher frequency of spontaneous DNA strand breaks in APEX2-null thymus. *DNA Repair*. **7**, 1437-1454 (2008)
  20. Refolo, L.M., Salton, S.R.J., Anderson, J.P., Mehta, P., Robakis, N.K. Nerve and epidermal growth factors induce the release of the Alzheimer Amyloid precursor from PC 12 cell cultures. *Biochem Biophys Res Commun*. **164**, 664-670 (1989)
  21. 平成 26 年版厚生労働白書 健康長寿社会の実現に向けて～健康・予防元年～. <http://www.mhlw.go.jp/wp/hakusyo/kousei/14/>.
  22. 鈴木建夫. 食品の抗酸化機能, 老化抑制と食品. 食品総合研究所編集. アイピーシー, 東京, p.p.1-7 (2002)

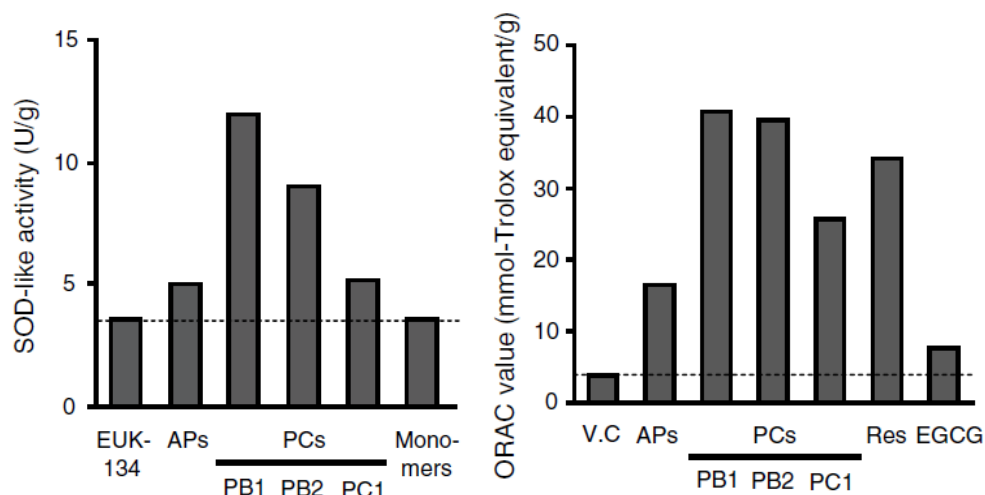
23. 津志田藤二郎. 食品の抗酸化機能, 老化抑制と食品. 食品総合研究所編集. アイピーシー, 東京, p.10 (2002)
24. Packer, L. *Vitamin E cycle and benefits to health, Active oxygens, lipid peroxides, and antioxidants*, Yagi, K. (Ed.). Japan Sci. Soc. Press, Tokyo, Japan/CRC Press, Boca Raton, FL, p.p. 247-255 (1993)
25. 藤本健四郎. 天然抗酸化剤, 抗酸化物質 フリーラジカルと生体防御, 二木鋭雄, 島崎弘幸, 美濃真 編集. 学会出版センター, 東京, p.p.107-115 (1994)
26. 酸化ストレスマーカー, 二木鋭雄, 内田浩二, 野口範子編集. 学会出版センター, 東京, p. 12 (2005)
27. Harman, D., Eddy, D.E. Free radical theory of aging: beneficial effect of adding antioxidants to the maternal mouse diet on life span of offspring; possible explanation of the sex difference in longevity. *Age*. **2**, 109-122 (1979)
28. 食品と開発編集部. 抗酸化能指標統一化に向けた動向と測定装置・キット・サービス. *食品と開発*. **48**, 33-36 (2013)
29. 吉田隆志. ポリフェノールの定義と分類, 植物ポリフェノール含有素材の開発-その機能性と安全性. シーエムシー出版, 東京, p.p. 3-11 (2007)
30. Food and Agriculture Organization of the United Nations, FAOSTAT database (FAOSTAT, 2012). Available at <http://faostat.fao.org/>.
31. Kahle, K., Kraus, M., Richling, E. Polyphenol profiles of apple juices. *Mol Nutr Food Res*. **49**, 797-806 (2005)
32. Kruger, M. J., Davies, N., Myburgh, K. H., Lecour, S. Proanthocyanidins, anthocyanins and cardiovascular diseases. *Food Res Int*. **59**, 41-52 (2014)
33. Shoji, T., Masumoto, S., Moriichi, N., Kanda, T., Ohtake, Y. Apple (*Malus pumila*) procyanidins fractionated according to the degree of polymerization using normal-phase chromatography and characterized by HPLC-ESI/MS and MALDI-TOF/MS. *J Chromatogr A*. **1102**, 206-213 (2006)
34. Porter, L.J. *Flavans and Proanthocyanidins, The Flavonoids: Advances in Research Since 1986*, Harborne, J. B. (ed.). Chapman & Hall, London, U.K., p.p. 23-55 (1993)
35. Yanagida, A., Kanda, T., Shoji, T., Ohnishi-Kameyama, M., Nagata, T. Fractionation of apple procyanidins by size-exclusion chromatography. *J Chromatogr A*. **855**, 181-190 (1999)
36. Santos-Buelga, C., Scalbert, A. Proanthocyanidins and tannin-like compounds: Nature, occurrence, dietary intake and effects on nutrition and health. *J Sci Food Agric*. **80**, 1094-1117 (2000)
37. Nakashima, S., Oda, C., Masuda, S., Tagashira, M., Kanda, T. Isolation and structure elucidation of tetrameric procyanidins from unripe apples (*Malus pumila* cv. Fuji) by NMR spectroscopy. *Phytochemistry*. **83**, 144-152 (2012)
38. Montero, L., Herrero, M., Ibáñez, E., Cifuentes, A. Profiling of phenolic compounds from different apple varieties using comprehensive two-dimensional liquid chromatography. *J Chromatogr A*. **1313**, 275-283 (2013)
39. Bors, W., Heller, W., Michel, C., Saran, M. Flavonoids as antioxidants: determination of radical-scavenging efficiencies. *Methods Enzymol*. **186**, 343-355 (1990)
40. Pietta, P.G. Flavonoids as antioxidants. *J Nat Prod*. **63**, 1035-1042 (2000)
41. Mursu, J., Voutilainen, S., Nurmi, T., Tuomainen, T.P., Kurl, S., Salonen, J.T. Flavonoid intake and the risk of ischaemic stroke and CVD mortality in middle-aged Finnish men: the Kuopio Ischaemic Heart Disease Risk Factor Study. *Br J Nutr*. **100**, 890-895 (2008)
42. Scalbert, A., Johnson, I.T., Saltmarsh, M. Polyphenols: antioxidants and beyond. *Am J Clin Nutr*. **81 (Suppl 1)**, 215S-217S (2005)

43. Peskin, A.V., Winterbourn, C.C. A microtiter plate assay for superoxide dismutase using a water-soluble tetrazolium salt (WST-1). *Clin Chim Acta*. **293**, 157-166 (2000)
44. Ishimoto, H., Tai, A., Yoshimura, M., Amakura, Y., Yoshida, T., Hatano, T., Ito, H. Antioxidative properties of functional polyphenols and their metabolites assessed by an ORAC assay. *Biosci Biotechnol Biochem*. **76**, 395-399 (2012)
45. Sunagawa, T., Masuda, I., Shimizu, T. *Anti-aging effects of apple procyanidins. Proanthocyanidins: Food Sources, Antioxidant Properties and Health Benefits*. Nova Science Publishers, Hauppauge, NY, p.p. 139-159 (2015)
46. Osada, K., Funayama, M., Fuchi, S. Effects of dietary procyanidins and tea polyphenols on adipose tissue mass and fatty acid metabolism in rats on a high fat diet. *J Oleo Sci*. **55**, 79-89 (2006)
47. Osada, K., Suzuki, T., Kawakami, Y., Senda, M., Kasai, A., Sami, M., Ohta, Y., Kanda, T., Ikeda, M. Dose-dependent hypocholesterolemic actions of dietary apple polyphenol in rats fed cholesterol. *Lipids*. **41**, 133-139 (2006)
48. Akiyama, H., Sato, Y., Watanabe, T., Nagaoka, M.H., Yoshioka, Y., Shoji, T., Kanda, T., Yamada, K., Totsuka, M., Teshima, R., Sawada, J., Goda, Y., Maitani, T. Dietary unripe apple polyphenol inhibits the development of food allergies in murine models. *FEBS Lett*. **579**, 4485-4491 (2005)
49. Miura, T., Chiba, M., Kasai, K., Nozaka, H., Nakamura, T., Shoji, T., Kanda, T., Ohtake, Y., Sato, T. Apple procyanidins induce tumor cell apoptosis through mitochondrial pathway activation of caspase-3. *Carcinogenesis*. **29**, 585-593 (2008)
50. Sugiyama, H., Akazome, Y., Shoji, T., Yamaguchi, A., Yasue, M., Kanda, T., Ohtake, Y. Oligomeric procyanidins in apple polyphenol are main active components for inhibition of pancreatic lipase and triglyceride absorption. *J Agric Food Chem*. **55**, 4604-4609 (2007)
51. 神田智正, 庄司俊彦. プロアントシアニン類(縮合型タンニン類), 植物ポリフェノール含有素材の開発-その機能性と安全性. シーエムシー出版, 東京, p.p. 256-264 (2007)
52. 最新農業技術事典, 農業・生物系特定産業技術研究機構 編集. 農山漁村文化協会, 東京. p.p.241-242, 1576 (2006)
53. 特許第 3521155 号
54. 2014 年 チルド飲料の市場分析調査—PB 商品の拡大と CVS コーヒーの登場で踊り場を迎えるチルド飲料市場—. 総合企画センター大阪, 大阪. p.p.103-110 (2014)
55. Baur, J.A., Pearson, K.J., Price, N.L., Jamieson, H.A., Lerin, C., Kalra, A., Prabhu, V.V., Allard, J.S., Lopez-Lluch, G., Lewis, K., Pistell, P.J., Poosala, S., Becker, K.G., Boss, O., Gwinn, D., Wang, M., Ramaswamy, S., Fishbein, K.W., Spencer, R.G., Lakatta, E.G., Le Couteur, D., Shaw, R.J., Navas, P., Puigserver, P., Ingram, D.K., de Cabo, R., Sinclair, D.A. Resveratrol improves health and survival of mice on a high-calorie diet. *Nature*. **444**, 337-342 (2006)



**Fig. 1.2** The composition of apple polyphenols (APs).

The elution profiles of APs, tea polyphenols and grape seed polyphenols using gel chromatography<sup>(35)</sup>. The data were reproduced.



**Fig. 1.3** APs and apple PCs have anti-oxidant activity *in vitro*<sup>(45)</sup>.

(A) The superoxide dismutase (SOD)-like activity of polyphenols. The SOD-like activity was determined using the cellular xanthine/xanthine oxidase system as a superoxide source<sup>(43)</sup>. (B) The oxygen radical absorbance capacity (ORAC) values of polyphenols. The ORAC assay was assessed according to the method described by Ishimoto et al.<sup>(44)</sup>. The 2,2'-azobis(2-amidinopropane)dihydrochloride was used as a peroxy radical generator, and 6-hydroxy-2,3,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acids (Trolox) was used as a standard. Monomers: monomer fraction of APs, V.C: vitamin C, Res: *trans*-resveratrol, EGCG: (-)-epigallocatechin-3-gallate.

## 第2章

### リンゴポリフェノールのラットにおけるコレステロール値および

### 肝臓コレステロール代謝遺伝子発現への影響

#### 2.1 緒言

高コレステロール血症は、血中コレステロールが過剰状態の症状をさし、食事からの継続的なコレステロールの高用量摂取や、コレステロール代謝障害によって引き起こされ、ひいては心血管疾患の発症に寄与する<sup>(1)</sup>。また、高コレステロール血症は過食または運動不足などの生活習慣が原因で起こる場合も多く、生活習慣病の判定指標のひとつとされている<sup>(2)</sup>。コレステロール代謝に主要な役割を果たす臓器は肝臓であり、コレステロール生合成、異化、ステロイド代謝産物の輸送、および内部コレステロールの恒常性維持を制御する。一方、スタチンはコレステロール生合成の律速酵素であるヒドロキシメチルグルタリル-CoA(HMG-CoA)還元酵素を阻害することによりコレステロール値を低下させることから、典型的な高コレステロール血症薬として使用されている<sup>(3)</sup>。しかし、コレステロールの合成量を低下させるという作用機序では、もともと肝臓でのコレステロール合成量が少ない患者や、小腸からのステロイド化合物の吸収量が高い患者にとっては効果がない。スタチンの使用は、肝機能低下等の副作用を引き起こす懸念もある<sup>(4)</sup>。一方、食品の摂取による高コレステロール血症予防は、副作用がなく毎日安全に摂取できるため望ましいと考えられる。

リンゴポリフェノール(AP)は、これまでがん、アレルギー等に対して抑制作用を有することが報告されている<sup>(5,6)</sup>。また、高脂肪食摂取による体脂肪増加に対する改善作用が報告されており<sup>(7)</sup>、脂質代謝に対する制御作用も明らかとなっている<sup>(8)</sup>。しかし、APによるコレステロール代謝への影響についての報告はなかった。

第2章では、APの生活習慣病に対する影響について検証するため、コレステロール負荷ラットにおけるAPのコレステロール値への影響について検討した。また、AP摂取による改善作用の詳細を理解するために、同ラットの肝臓の遺伝子発現解析を実施した結果を記述する。

#### 2.2 材料および方法

### 2.2.1 AP の調製

AP は Ohnishi-Kameyama らの方法にしたがって調製した<sup>(9)</sup>。リンゴ(*Malus pumila* Mill. cv. Fuji) は、産地が青森県または中国山西省地域の幼果(未熟果)を使用した。果実の重量は、1 個あたり約 5~25 g であった。幼果を使用するのは、成熟果と比べて果実中のポリフェノール濃度が最大であるためである。幼果を洗浄後、破碎し 0.1%(w/v)  $K_2S_2O_5$  を添加して圧搾した。ろ過処理した澄清果汁を吸着樹脂カラム(SEPABEADS® SP-850、三菱化学)へ通液し、吸着した糖類と有機酸を蒸留水で洗浄した後、ポリフェノールを 80%(v/v)エタノールで溶出した。その後、ロータリーエバポレーターで濃縮し、凍結乾燥したものを AP とした。PC およびモノマー画分の調製は、AP をメタノールに溶解し、順相クロマトグラフィー(Inertsil PREP-SIL、ジーエルサイエンス)へ供した。プロシアニジン類(PC)とモノマー画分は、ヘキサン、メタノールおよび酢酸エチルから成る移動相を用いて分離した。溶出液を集め、ロータリーエバポレーターで濃縮し、凍結乾燥したものを PC およびモノマー画分とした。AP 中の主要なポリフェノール、すなわちクロロゲン酸、*p*-クマロイルキナ酸、(+)-カテキン、(-)-エピカテキン、フロリジン、フロレチンキシログルコシド、プロシアニジン B1、プロシアニジン B2、プロシアニジン C1 の分析は、逆相 HPLC を使用した。分析は 40°C で、流速 1.0 mL/min とし、Inertsil ODS III 逆相カラム(ジーエルサイエンス)を用いた。溶出液を 280nm における吸光度でモニターした。移動相は、最初の 10 分は 10 mmol/L  $KH_2PO_4$  溶液(pH 2.0、リン酸を用いて調整)とメタノールとの体積比 80:20 混合液とした。つぎの 20 分は、メタノール比を 20%(v/v) から 27.5%(v/v)まで直線的なグラジエントで変化させた。つぎの 20 分は、メタノール比を 27.5%(v/v)から 50%(v/v)まで直線的なグラジエントで変化させた。最後の 20 分は、メタノール比 50%(v/v)とした。PC の重合度分析は、順相 HPLC<sup>(10)</sup>を使用した。分析は 25°C で、流速 1.0 mL/min とし、Inertsil SIL カラム(ジーエルサイエンス)を用いた。溶出液を 280nm における吸光度でモニターした。移動相は、ヘキサン、メタノール、酢酸エチルの混合液を使用して、50 分間で体積比 7:3:1 から 2:3:1 まで直線的なグラジエントで変化させた。AP、PC およびモノマー画分の各成分組成を Table 2.1、2.2 および 2.3 に示す。

### 2.2.2 使用動物および食餌

3 週齢オスの Sprague-Dawley ラット(日本クレア)を、照明時間 8:00~20:00、温度 20~23°C で制御した環境で、個別ケージで飼育を開始した。餌は AIN-93G(オリエンタル酵母工業)を 1 週間与えた後に、体重を基に 1 群 8~9 匹から成る 3 試験群に分類し、0.5%(w/w)コレステロールを含む AIN-93G を与えた。AP を摂取しない対照群、AP-0.2%(w/w)群、AP-0.5%(w/w)群の 3 試験群について、AIN-93G をベースとした食餌の組成を Table 2.4 に示す。AP-0.5 試験群で、摂食量がわ



ずかに減少する可能性が考えられたので、対照群の摂食量を AP-0.5 試験群の摂食量に合わせて給餌した(ペアフィード)。30 日後、前夜から絶食したラットを、ジエチルエーテル麻酔下で腹大動脈から全採血した後、種々の臓器を採取した。解剖 10 日前に、糞便を 2 日間回収し、凍結乾燥して保存した。動物実験は、弘前大学の実験動物倫理委員会によって承認されたものである。

### 2.2.3 脂質および糞便ステロイド分析

肝臓、血清中の脂質、および糞便中ステロイドの測定方法は、文献に従った<sup>(11)</sup>。一次胆汁酸量は、ケノデオキシコール酸(CDCA)、コール酸(CA)、 $\alpha$ -ムリコール酸( $\alpha$ -MCA)、および  $\beta$ -ムリコール酸( $\beta$ -MCA)の合計量と定義した。

### 2.2.4 RNA 調製

小さな断片(一辺 5.0 mm 以下)にカットした肝臓を、オーバーナイトで 4°C にて RNAlater(Ambion)液に浸漬し、その後液体を取り除き、-80°C で保存した。total RNA は、RNeasy Mini Kit(QIAGEN)を使用して添付のプロトコールに従い抽出した。得られた total RNA は、Agilent 2100 バイオアナライザおよび RNA 6000 Nano-LabChip kit(Agilent technologies)を使用して電気泳動を行い、未分解であることを確認した後、リアルタイム RT-PCR および DNA マイクロアレイ解析に使用した。

### 2.2.5 リアルタイム PCR

単鎖 cDNA は、1  $\mu$ g の total RNA から High Capacity cDNA Archive Kit (Applied Biosystems)を使用して、添付のプロトコールにしたがって作製した。リアルタイム PCR は、SYBR Green PCR Universal Master Mix(Applied Biosystems)と ABI PRISM 7700 Sequence Detector(Applied Biosystems)を使用して、cDNA を鋳型として、基本的に添付のプロトコールに準じて行った。遺伝子特異的プライマーは、Primer Express v1.5 ソフトウェア(Applied Biosystems)を使用して設計した。使用したプライマーの配列を Table 2.5 に示す。PCR サイクルは、以下のように行った: ステップ 1: 50°C、2 min、ステップ 2: 95°C、10 min、ステップ 3: (95°C、15 s、60°C、1 min)  $\times$  40 サイクル。グリセルアルデヒド-3-リン酸脱水素酵素遺伝子を内部コントロール遺伝子として、遺伝子発現量を補正した。

### 2.2.6 DNA マイクロアレイ

DNA マイクロアレイ解析は、GeneChip システム(Affymetrix)を使用して行った。同一試験群内の個体由来 RNA を等量混合し、アレイにつき 2  $\mu$ g の total RNA を実験に供した。RNA ラベル化、

ハイブリダイゼーション、洗浄、および染色の方法は、メーカーのプロトコールに従った。ラベル化 cRNA を、15,923 個の遺伝子プローブを有する Rat Expression Array 230A に対してハイブリダイズした。各試験群につき、2 枚のアレイを使用した。蛍光シグナルは、Gene Chip Scanner GC3000 でスキャンした。蛍光シグナルは、Affymetrix Gene Chip Operation System v1.0 を使用して数値に変換した。解析に使用するプローブデータの選抜方法は、文献に従った<sup>(8)</sup>。すなわち、フラグの種類、および raw 値の大小に基づいて、解析に適切なプローブを選抜した。6 枚のアレイのうち、少なくとも 5 枚において、フラグが「present」、または「marginal」であり、かつ試験群内の raw 平均値が少なくとも 2 試験群で 20 以上であるか、少なくとも 1 試験群で 50 以上であるプローブを選抜した。選抜したプローブのデータは、遺伝子発現解析ソフトウェア GeneSpring v7.3(Agilent Technologies)を使用して解析した。

## 2.2.7 統計解析

統計解析は、SPSS v11.5 ソフトウェアを使用した。 $P < 0.05$  を有意とした。結果は、平均値±標準誤差で表示した。試験群間の平均値比較は分散分析(ANOVA) によって行った。試験群間の多重比較は、その後の検定として Dunnett 法で行った<sup>(12)</sup>。

## 2.3 結果

### 2.3.1 リンゴポリフェノール摂取によるコレステロール負荷ラットにおけるコレステロール値への影響

筆者らは、予備試験で 30 日間 0.5%(w/w)コレステロールを含む飼料を摂取したラットの血清総コレステロール値が、コレステロールを含まない飼料を摂取した群と比べて有意に増大し、それぞれ  $1.68 \pm 0.10$  mmol/L、および  $1.28 \pm 0.11$  mmol/L(各  $n = 8$ 、 $P = 0.0021$ )であることを観察した。さらに、0.5%(w/w)コレステロールを含む飼料を摂取したラットの血清 non-HDL コレステロール値は、コレステロールを含まない飼料を摂取した群と比べて同様に有意に増大し、それぞれ  $1.00 \pm 0.09$  mmol/L、および  $0.31 \pm 0.06$  mmol/L(各  $n = 8$ 、 $P < 0.0001$ )であることを観察した。以上より、本試験での 0.5%(w/w)のコレステロールを含む飼料の摂取は、適切な高コレステロール血症モデルであると考えられた。

試験期間中の体重増加量、摂餌量、試験終了時の肝臓および腸間膜白色脂肪重量を Table 2.6 に示す。摂餌量は、試験群間で有意差は認められなかった。AP-0.2 群は対照群と比べて体重が増加したが、AP-0.5 群では変動は見られなかった。肝臓重量、および腸間膜白色脂肪量は、

AP-0.5 群で有意に減少した。肝臓コレステロール量、血清総コレステロール値、および血清 non-HDL コレステロール値の結果を Fig. 2.1A、B および C に示す。AP-0.5 群では対照群と比べて、肝臓コレステロール量の減少傾向がみられ( $P = 0.0933$ )、血清コレステロール値および non-HDL コレステロール値は有意に減少した( $P = 0.0171$  および  $P = 0.0066$ )。糞便中のコレステロール量、一次胆汁酸量、および血清 non-HDL コレステロール値と糞便中一次胆汁酸の相関を Fig. 2.2A、B および C に示す。糞便中のコレステロール量は、対照群と比べて有意に増大した(1.63 倍、 $P < 0.0001$ )。AP の摂取は、用量依存的に糞便中の一次胆汁酸量を増大した(AP-0.2 群: 1.89 倍、 $P = 0.0124$ 、AP-0.5 群: 2.96 倍、 $P < 0.0001$ )。血清 non-HDL コレステロール値と糞便中の一次胆汁酸量に、有意な負の相関が確認された( $r = -0.6251$ 、 $P = 0.0011$ )。

### 2.3.2 リンゴポリフェノール摂取によるコレステロール負荷ラットの肝臓におけるコレステロール合成および輸送遺伝子の発現への影響

HMG-CoA 還元酵素(HMGCR)、低密度リポタンパク質(LDL)受容体(LDLR)の発現量、および血清 non-HDL コレステロール値と LDLR 発現量の相関を、Fig. 2.3A および B に示す。AP-0.5 群では LDLR 発現量が、対照群と比べて 1.59 倍高値であった( $P < 0.0001$ )。血清 non-HDL コレステロール値と LDLR 発現量に、有意な負の相関が確認された( $r = -0.6624$ 、 $P = 0.0003$ )。糞便中の胆汁酸量と LDLR 発現量に、有意な正の相関が確認された( $r = 0.6130$ 、 $P = 0.0014$ )。試験群間で HMG-CoA 還元酵素(HMGCR)の発現量に有意な差は認められなかった。DNA アレイにより解析した他のコレステロール生合成遺伝子群の発現についての結果を Table 2.7 に示す。転写因子であるステロール調節要素結合蛋白質 2(SREBP-2)を含む 10 個のプローブについて、AP の摂取により発現量の変化は認められなかった。

### 2.3.3 リンゴポリフェノール摂取によるコレステロール負荷ラットの肝臓におけるコレステロール異化代謝遺伝子の発現への影響

コレステロール異化代謝、胆汁酸合成に関連するコレステロール 7 $\alpha$ -水酸化酵素(CYP7A1)、ステロール 12 $\alpha$ -水酸化酵素(CYP8B1)の発現量を Fig. 2.3A に示す。胆汁酸合成の律速酵素である CYP7A1 発現量は、試験群間で有意な差は認められなかった。一方、CYP8B1 発現量は、AP-0.5 群で有意に増大した(1.50 倍、 $P = 0.0278$ )。

ステロイド代謝関連の転写因子である Farnesoid X 受容体(FXR、NR1H4)の発現量、および糞便中一次胆汁酸量と FXR 発現量の相関を Fig. 2.4A および B に示す。FXR 発現量は、AP-0.5 群で有意に増大した(1.56 倍、 $P = 0.0021$ )。CYP7A1 の発現量と FXR の発現量に、負の相関が確認された( $r = -0.3756$ 、 $P = 0.0850$ )。糞便中の一次胆汁酸量と FXR の発現量に、有意な正の相関

が確認された( $r = 0.5765$ ,  $P = 0.0040$ )。

#### 2.3.4 リンゴポリフェノール摂取によるコレステロール負荷ラットの肝臓における DNA アレイ解析

DNA アレイ試験では、7445 個のプローブが解析条件に適合した。AP-0.2 群および AP-0.5 群で対照群と比べて 1.5 倍以上発現量が増大したプローブ数は、104 個(全体の 1.4%)および 149 個(2.0%)であり、1.5 倍以上発現量が減少したプローブ数は、71(1.0%)および 109 の(1.5%)であった。DNA アレイ解析より、AP 用量依存的に増大した遺伝子の発現量を Table 2.8 に示す。ステロイド代謝に関連するステロイド 17 $\alpha$ -水酸化酵素および 17 $\beta$ -ヒドロキシステロイド脱水素酵素の発現量が、AP 用量依存的に増大することが確認された。肝細胞核内因子である HNF-3 $\beta$  および HNF-6 の発現量も同様に、AP 用量依存的に増大した。

## 2.4 考察

AP がコレステロール値に及ぼす影響については、AP が腸管でコレステロールのミセル形成を阻害し、コレステロールの可溶性を減少させることによりコレステロールの排泄を促進することが報告されている<sup>(11)</sup>。また、AP が腸管でコレステロールのエステル化およびリポタンパク質分泌を低減させることによりコレステロール値を改善することも報告されている<sup>(13)</sup>。本研究では、AP がコレステロールと同様に、糞便中へ一次胆汁酸の排出を促進することを示した。また、血液 non-HDL コレステロールと糞便中の一次胆汁酸の間に負の相関があることを示した。以上の結果より、AP がコレステロール代謝へ影響を及ぼす可能性が考えられたため、AP 摂取によるコレステロール代謝遺伝子の発現変動を検証した。

AP の 0.5%(w/w)摂取が LDLR 発現量を増加させたが、試験群内で発現量に個体間のばらつきが小さいことが確認された。また、血清 non-HDL コレステロール値と LDLR 発現量の間に負の相関が認められた。LDLR については、遺伝的な欠損が家族性の高コレステロール血症の原因となることが報告されている<sup>(14)</sup>。LDLR は肝細胞表面で発現され、血液中の LDL や超低密度リポタンパク質(VLDL)のようリポタンパク質を構成するアポリポ蛋白質 B を認識する。LDLR による循環血液からの LDL や VLDL の除去は、血液中のコレステロール濃度を調整するメカニズムのひとつである。これまでに、*in vitro* でフラボノイド類が肝細胞の LDLR の遺伝子発現を上昇させることが報告されている<sup>(15-17)</sup>。本研究では、*in vivo* でも AP が肝臓の LDLR 遺伝子発現を上昇させることを示した。

高コレステロール血症の予防および治療に使用されるスタチンは、コレステロール合成系の抑

制によりコレステロール値を改善する<sup>(2)</sup>。HMGCR はコレステロール生合成経路の律速酵素である。本研究では、AP の用量依存的な HMGCR 発現変動や、HMGCR 発現量と血清コレステロール値との相関性も認められなかった。DNA アレイより、AP の摂取が他のコレステロール生合成関連遺伝子の発現にも影響しないことを明らかにした。さらに、HMGCR のようなコレステロール生合成関連遺伝子の発現を促進する転写因子 SREBP-2 の発現変動も認められなかった<sup>(18)</sup>。この結果は、AP はスタチンと異なりコレステロール生合成に影響しない可能性を示している。

コレステロールは、肝臓でコレステロール構造が修飾され、側鎖の酸化および分解後に、胆汁酸に変換されるという主要な代謝経路を経由して除去される。CYP8B1 は 12 $\alpha$  位の水酸化反応を触媒し、CA の合成に関係する<sup>(19)</sup>。本研究で、CYP8B1 発現量が AP0.5%(w/w)摂取によって増大した。この結果から、AP がコレステロール異化および胆汁酸生合成を促進する理由を部分的に説明していると考えられた。

CYP7A1 はコレステロールから 7 $\alpha$ -ヒドロキシコレステロールへ変換する 7 $\alpha$ -水酸化反応を触媒し、コレステロール異化および胆汁酸生合成に重要な役割を果たし、胆汁酸合成経路の律速酵素である<sup>(20)</sup>。CYP7A1 については、遺伝子欠損と高コレステロール血症との関連性が報告されている<sup>(21)</sup>。また、コレステロールを低下させる効果には、CYP7A1 の発現量上昇が関連することも報告されている<sup>(22-24)</sup>。一方、CYP7A1 が胆汁酸によってフィードバック阻害され発現が減少することが示されている<sup>(25)</sup>。既報では、コレステロール恒常性の改良は、CYP7A1 遺伝子発現量の増大と必ずしも関係しないことが示されている<sup>(26,27)</sup>。本研究は、AP 摂取群での CYP7A1 発現量の減少傾向が、胆汁酸プールの顕著な増加によるものである可能性が示唆された。

AP の摂取は、コレステロールおよび胆汁酸代謝を制御する FXR の発現量を増大させた<sup>(28)</sup>。CDCA のような一次胆汁酸は、FXR の生理的リガンドとしてはたらく<sup>(29,30)</sup>。胆汁酸によって活性化された FXR は、転写レベルで長期にわたり CYP7A1 発現を抑制する<sup>(31,32)</sup>。本研究で、AP の摂取は糞便中の一次胆汁酸量および肝臓 FXR 発現量の両者を増大させた。また、一次胆汁酸排泄量と FXR 発現量に正の相関が認められた。肝臓、胆嚢および腸管中の胆汁酸プール量は本研究では測定しなかった。しかし、筆者の結果により(Figs. 2.2C, 2.4B)、FXR および胆汁酸の両者の変化傾向によって、肝臓の CYP7A1 発現を制御する可能性が示唆された。

DNA アレイ解析は、AP の摂取がステロイド 17 $\alpha$ -水酸化酵素と 17 $\beta$ -ヒドロキシステロイド脱水素酵素の遺伝子発現を上昇させることを明らかにした。この遺伝子は、ステロイドホルモン合成経路に関与することが報告されている<sup>(33)</sup>。さらに、AP の摂取が HNF-3 $\beta$  および HNF-6 の発現量を増大することを明らかにした。この遺伝子は、炭水化物と脂質代謝に関連する核転写因子である。HNF-3 $\beta$  は FOXA2 という肝臓胆汁酸恒常性に関与し<sup>(34,35)</sup>、HNF-6 は HNF-3 $\beta$  の転写を増強することが報告されている<sup>(36)</sup>。この発現変動は、AP の摂取がステロイドおよび胆汁酸代謝に影響する

ことを示している。

本章での検証より、高コレステロール負荷ラットにおいて AP の摂取は肝臓で LDLR およびステロイド代謝遺伝子の発現上昇を促進して、血中のコレステロール値の改善に寄与する可能性が示唆された。AP は、高コレステロール血症の予防に有望な食品素材である可能性が考えられた。

## 2.5 要約

本章では AP の生活習慣病に対する影響について検証するため、コレステロール負荷ラットにおける AP のコレステロール値への影響について解析した。また、AP 摂取による改善作用の詳細を理解するために、同ラットの肝臓の遺伝子発現解析を実施した。4 週齢のオス SD ラットに対して、30 日間、0.5%(w/w)のコレステロールを含み、かつ 0%(w/w、対照群)、0.2%(w/w)、および 0.5%(w/w)の AP を含む飼料を給餌した。AP0.5%(w/w)摂取は、血清総コレステロール値を有意に改善し(対照群に対して 0.69 倍、 $P < 0.05$ )、肝臓の LDL 受容体(LDLR)発現量を有意に増大した(対照群に対して 1.59 倍、 $P < 0.0001$ )。血清 non-HDL コレステロール値と LDLR 発現量は負の相関が認められた( $P < 0.001$ )。また、AP0.5%(w/w)摂取は、糞便中の一次胆汁酸量を有意に増大し(対照群に対して 2.96 倍、 $P < 0.0001$ )、ステロール 12 $\alpha$ -水酸化酵素(CYP8B1)のようなステロイド異化代謝遺伝子の発現量を増大した。血清コレステロール値と、胆汁酸生合成経路の律速酵素であるコレステロール 7 $\alpha$ -水酸化酵素(CYP7A1)の発現量には相関は確認されなかった。胆汁酸生合成の制御に関わる farnesoid X 受容体(FXR)の発現量は、AP0.5%(w/w)摂取により有意に増大し(対照群に対して 1.56 倍、 $P < 0.01$ )、胆汁酸排泄量と正の相関が認められた( $P < 0.01$ )。高コレステロール負荷ラットにおいて、AP の摂取は肝臓で LDLR およびステロイド代謝遺伝子の発現上昇を促進して、血中のコレステロール値の改善に寄与する可能性が示唆された。

## 2.6 参考文献

1. Parets, A.D., Adlersberg, D. Hereditary hypercholesterolemia; a factor in the genesis of coronary atherosclerosis; studies of patients under age of 50. *J. Clin. Invest.* **27**, 551 (1948)
2. 及川眞一, 生活習慣病としての高脂血症. *J. Nippon Med. Sch.* **68**, 194-197 (2001)
3. Conde, K., Vergara-Jimenez, M., Krause, B.R., Newton, R.S., Fernandez, M.L. Hypocholesterolemic actions of atorvastatin are associated with alterations on hepatic

- cholesterol metabolism and lipoprotein composition in the guinea pig. *J. Lipid Res.* **37**, 2372-2382 (1996)
4. 伊藤善規, 大石了三. 脂質低下剤による肝障害および筋障害について. *TDM 研究* **23**, 32-39 (2006)
  5. Hibasami, H., Shoji, T., Shibuya, I., Higo, K., Kanda, T. Induction of apoptosis by three types of procyanidin isolated from apple (Rosaceae *Malus pumila*) in human stomach cancer KATO III cells. *Int J Mol Med.* **13**, 795-799 (2004)
  6. Akiyama, H., Sato, Y., Watanabe, T., Nagaoka, M.H., Yoshioka, Y., Shoji, T., Kanda, T., Yamada, K., Totsuka, M., Teshima, R., Sawada, J., Goda, Y., Maitani, T. Dietary unripe apple polyphenol inhibits the development of food allergies in murine models. *FEBS Lett.* **579**, 4485-4491 (2005)
  7. Osada, K., Funayama, M., Fuchi, S. Effects of dietary procyanidins and tea polyphenols on adipose tissue mass and fatty acid metabolism in rats on a high fat diet. *J Oleo Sci.* **55**, 79-89 (2006)
  8. Ohta, Y., Sami, M., Kanda, T., Saito, K., Kato, H., Osada, K. Gene expression analysis of the anti-obesity effect by apple polyphenols in rats fed a high fat diet or a normal diet. *J. Oleo Sci.* **55**, 305-314 (2006)
  9. Ohnishi-Kameyama, M., Yanagida, A., Kanda, T., Nagata, T. Identification of catechin oligomers from apple (*Malus pumila* cv. Fuji) in matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry and fast-atom bombardment mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom.* **11**, 31-36 (1997)
  10. Yanagida, A., Kanda, T., Takahashi, T., Kamimura, A., Hamazono, T., Honda, S. Fractionation of apple procyanidins according to their degree of polymerization by normal-phase high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr A.* **890**, 251-259 (2000)
  11. Osada, K., Suzuki, T., Kawakami, Y., Senda, M., Kasai, A., Sami, M., Ohta, Y., Kanda, T., Ikeda, M. Dose-dependent hypocholesterolemic actions of dietary apple polyphenol in rats fed cholesterol. *Lipids.* **41**, 133-139 (2006)
  12. Ludbrook, J. Multiple comparison procedures updated. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* **25**, 1032-1037 (1998)
  13. Vidal, R., Hernandez-Vallejo, S., Pauquai, T., Texier, O., Rousset, M., Chambaz, J., Demignot, S., Lacorte, J.M. Apple procyanidins decrease cholesterol esterification and lipoprotein secretion in Caco-2/TC7 enterocytes. *J. Lipid Res.* **46**, 258-268 (2005)
  14. Brown, M.S., Goldstein, J.L. A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. *Science.* **232**, 34-47 (1986)
  15. Chu, Y.F., Liu, R.H. Cranberries inhibit LDL oxidation and induce LDL receptor expression in hepatocytes. *Life Sci.* **77**, 1892-1901 (2005)
  16. Dávalos, A., Fernández-Hernando, C., Cerrato, F., Martínez-Botas, J., Gómez-Coronado, D., Gómez-Cordovés, C., Lasunción, M.A. Red grape juice polyphenols alter cholesterol homeostasis and increase LDL-receptor activity in human cells *in vitro*. *J. Nutr.* **136**, 1766-1773 (2006)
  17. Morin, B., Nichols, L.A., Zalasky, K.M., Davis, J.W., Manthey, J.A., Holland, L.J. The citrus flavonoids hesperetin and nobiletin differentially regulate low density lipoprotein receptor gene transcription in HepG2 liver cells. *J. Nutr.* **138**, 1274-1281 (2008)
  18. Norton, J.D., Shimomura, I., Brown, M.S., Hammer, R.E., Goldstein, J.L., Shimano, H. Activation of cholesterol synthesis in preference to fatty acid synthesis in liver and adipose tissue of transgenic mice overproducing sterol regulatory element-binding protein-2. *J. Clin.*

- Invest.* **101**, 2331-2339 (1998)
19. Elliott, W.H., Hyde, P.M. Metabolic pathways of bile acid synthesis. *Am J Med.* **51**, 568-579 (1971)
  20. Vlahcevic, Z.R., Stravitz, R.T., Heuman, D.M., Hylemon, P.B., Pandak, W.M. Quantitative estimations of the contribution of different bile acid pathways to total bile acid synthesis in the rat. *Gastroenterology.* **113**, 1949-1957 (1997)
  21. Pullinger, C.R., Eng, C., Salen, G., Shefer, S., Batta, A.K., Erickson, S.K., Verhagen, A., Rivera, C.R., Mulvihill, S.J., Malloy, M.J., Kane, J.P. Human cholesterol 7 $\alpha$ -hydroxylase (CYP7A1) deficiency has a hypercholesterolemic phenotype. *J. Clin. Invest.* **110**, 109-117 (2002)
  22. Bérard, A.M., Dumon, M.F., Darmon, M. Dietary fish oil up-regulates cholesterol 7 $\alpha$ -hydroxylase mRNA in mouse liver leading to an increase in bile acid and cholesterol excretion. *FEBS Lett.* **559**, 125-128 (2004)
  23. Spady, D.K., Cuthbert, J.A., Willard, M.N., Meidell, R.S. Adenovirus-mediated transfer of a gene encoding cholesterol 7 $\alpha$ -hydroxylase into hamsters increases hepatic enzyme activity and reduces plasma total and low density lipoprotein cholesterol. *J. Clin. Invest.* **96**, 700-709 (1995)
  24. Chen, W., Suruga, K., Nishimura, N., Gouda, T., Lam, V.N., Yokogoshi, H. Comparative regulation of major enzymes in the bile acid biosynthesis pathway by cholesterol, cholate and taurine in mice and rats. *Life Sci.* **77**, 746-757 (2005)
  25. Pandak, W.M., Li, Y.C., Chiang, J.Y.L., Studer, E.J., Gurley, E.C., Heuman, D.M., Vlahcevic, Z.R., Hylemon, P.B. Regulation of cholesterol 7  $\alpha$ -hydroxylase mRNA and transcriptional activity by taurocholate and cholesterol in the chronic biliary diverted rat. *J. Biol. Chem.* **266**, 3416-3421 (1991)
  26. Spady, D.K., Cuthbert, J.A., Willard, M.N., Meidell, R.S. Feedback regulation of hepatic 7 $\alpha$ -hydroxylase expression by bile salts in the hamster. *J. Biol. Chem.* **271**, 18623-18631 (1996)
  27. Tiemann, M., Han, Z., Soccio, R., Bollineni, J., Shefer, S., Sehayek, E., Breslow, J.L. Cholesterol feeding of mice expressing cholesterol 7 $\alpha$ -hydroxylase increases bile acid pool size despite decreased enzyme activity. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **101**, 1846-1851 (2004)
  28. Tall, A.R., Costet, P., Luo, Y. 'Orphans' meet cholesterol. *Nat. Med.* **6**, 1104-1105 (2000)
  29. Makishima, M., Okamoto, A.Y., Repa, J.J., Tu, H., Learned, R.M., Luk, A., Hull, M.V., Lustig, K.D., Mangelsdorf, D.J., Shan, B. Identification of a nuclear receptor for bile acids. *Science.* **284**, 1362-1365 (1999)
  30. Chiang, J.Y., Kimmel, R., Weinberger, C., Stroup, D. Farnesoid X receptor responds to bile acids and represses cholesterol 7 $\alpha$ -hydroxylase gene (CYP7A1) transcription. *J. Biol. Chem.* **275**, 10918-10924 (2000)
  31. Nagano, M., Kuroki, S., Mizuta, A., Furukawa, M., Noshiro, M., Chijiwa, K., Tanaka, M. Regulation of bile acid synthesis under reconstructed enterohepatic circulation in rats. *Steroids.* **69**, 701-709 (2004)
  32. Ando, H., Tsuruoka, S., Yamamoto, H., Takamura, T., Kaneko, S., Fujimura, A. Regulation of cholesterol 7 $\alpha$ -hydroxylase mRNA expression in C57BL/6 mice fed an atherogenic diet. *Atherosclerosis.* **178**, 265-269 (2005)
  33. Vogel, K., Bentley, P., Platt, K.L., Oesch, F. Rat liver cytoplasmic dihydrodiol dehydrogenase. Purification to apparent homogeneity and properties. *J. Biol. Chem.* **255**, 9621-9625 (1980)
  34. Wolfrum, C., Asilmaz, E., Luca, E., Friedman, J.M., Stoffel, M. Foxa2 regulates lipid metabolism and ketogenesis in the liver during fasting and in diabetes. *Nature.* **432**, 1027-1032 (2004)
  35. Bochkis, I.M., Rubins, N.E., White, P., Furth, E.E., Friedman, J.R., Kaestner, K.H.



- Hepatocyte-specific ablation of Foxa2 alters bile acid homeostasis and results in endoplasmic reticulum stress. *Nat. Med.* **14**, 828-836 (2008)
36. Rausa, F.M., Tan, Y., Costa, R.H. Association between hepatocyte nuclear factor 6 (HNF-6) and FoxA2 DNA binding domains stimulates FoxA2 transcriptional activity but inhibits HNF-6 DNA binding. *Mol. Cell. Biol.* **23**, 437-449 (2003)

Table 2.1 Composition of apple polyphenol

Component	Content (w/w)
Total procyanidins (catechin oligomers)	
Dimers	11.1
Trimers	12.3
Tetramers	8.7
Pentamers	5.9
Hexamers	4.9
Heptamers or greater	20.9
Total catechins	
(-)-Epicatechin	10.5
(+)-Catechin	2.0
Total chalcones	
Phloretin xyloglucoside	4.6
Phloridzin	1.9
Total phenolcarboxylic acids	
Chlorogenic acid	8.2
<i>p</i> -Coumaroylquinic acid	2.6

Table 2.2 Composition of procyanidins from apple polyphenol

Component	Content (w/w)
Dimers	17.4
Trimers	19.3
Tetramers	13.6
Pentamers	9.2
Hexamers	7.7
Heptamers or greater	32.8

Table 2.3 Composition of monomer fraction from apple polyphenol

Component	Content (%(w/w))
Total catechins	
(-)-Epicatechin	35.2
(+)-Catechin	6.7
Total chalcones	
Phloretin xyloglucoside	15.4
Phloridzin	6.4
Total phenolcarboxylic acids	
Chlorogenic acid	27.5
<i>p</i> -Coumaroylquinic acid	8.7

Table 2.4 Experimental diets composition

Ingredient	Control	AP-0.2	AP-0.5
	g/kg		
Cornstarch	412.5	410.5	407.5
Casein	200.0	200.0	200.0
$\alpha$ -Cornstarch	132.0	132.0	132.0
Sucrose	100.0	100.0	100.0
Soybean oil	50.0	50.0	50.0
Cellulose	50.0	50.0	50.0
Mineral mix (AIN-93)	35.0	35.0	35.0
Vitamin mix (AIN-93)	10.0	10.0	10.0
L-Cystine	3.0	3.0	3.0
Choline bitartrate	2.5	2.5	2.5
Cholesterol	5.0	5.0	5.0
Apple polyphenol	0.0	2.0	5.0

Table 2.5 Primers used for real-time RT-PCR

Genes	Forward primer sequence	Reverse primer sequence
<i>Gapd</i>	5'-CCGAGGGCCCACTAAAGG-3'	5'-TGCTGTTGAAGTCACAGGAGACA-3'
<i>Hmgcr</i>	5'-CCTGCAGATGCTAGGTGTTCAA-3'	5'-CATCACAGTGCCACACACAATT-3'
<i>Cyp7a1</i>	5'-CAAGTCAAGTGTCCCCCTCTAGA-3'	5'-ACTCAATATCATGTAGTGGTGGCAAA-3'
<i>Cyp8b1</i>	5'-TCTGCCATGCTCCCTGTAAGA-3'	5'-ACCACAGGTTTCCTCCTGAGA-3'
<i>Ldlr</i>	5'-AGCATAAACTTTGACAACCCAGTCT-3'	5'-TCCTGGCTGCGGCAAAT-3'
<i>Fxr</i>	5'-CCTCTGCTCGATGTCCTACAAA-3'	5'-GGAGGCAGGCGAAATGCT-3'

Table 2.6 Growth parameters and organ weights of rats fed the cholesterol- loaded diet containing AP for 30 days <sup>a</sup>

	Control	AP-0.2	AP-0.5
Initial body weight (g)	95.6 ± 2.1	95.6 ± 2.0	95.9 ± 2.2
Weight gain (g)	147 ± 3	158 ± 3 *	148 ± 3
Body weight (g)	243 ± 2	253 ± 3 *	244 ± 4
Total food intake (g)	496 ± 3	497 ± 3	497 ± 5
Liver weight / BW <sup>b</sup> (%)	3.51 ± 0.06	3.34 ± 0.06	3.23 ± 0.11 *
Mesenteric WAT <sup>c</sup> weight / BW (%)	1.35 ± 0.06	1.22 ± 0.08	1.11 ± 0.08 *
<i>n</i>	9	8	8

<sup>a</sup> Values are mean ± SEM \*Different from control group,  $P < 0.05$ .

<sup>b</sup> Body weight.

<sup>c</sup> White adipose tissue.

Table 2.7 Effects of dietary AP on expression of genes related to cholesterol biosynthesis in livers of rats fed high cholesterol diet

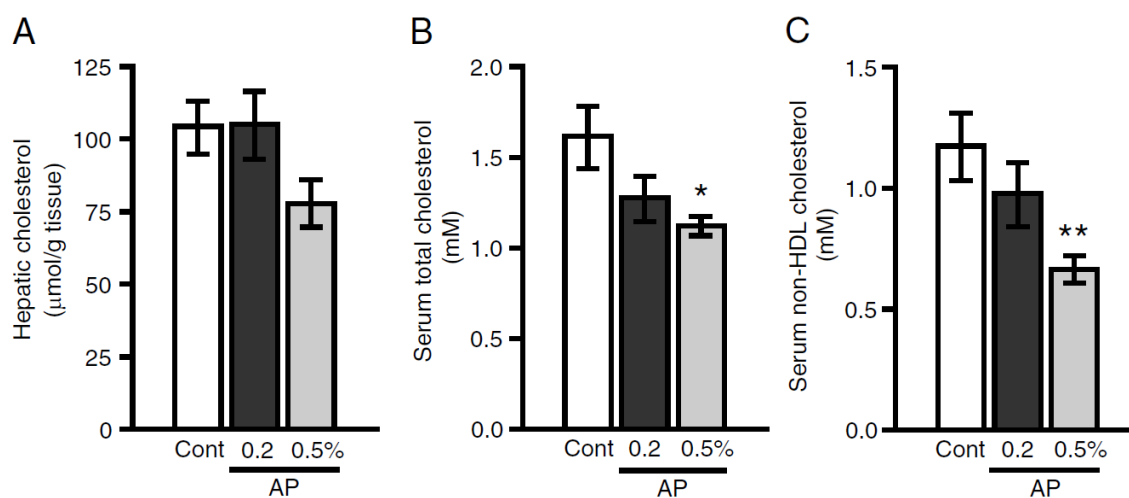
Affymetrix ID	Common name	Description	Fold change <sup>a</sup>	
			AP-0.2	AP-0.5
1367932_at	<i>Hmgcs1</i>	3-hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A synthase 1	1.06	1.40
1371979_at	<i>Srebp2</i>	sterol regulatory element binding protein 2	0.84	1.10
1372973_at	<i>Lss</i>	2,3-oxidosqualene: lanosterol cyclase	1.06	1.04
1370310_at	<i>Hmgcs2</i>	3-hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A synthase 2	1.14	1.04
1368189_at	<i>Dhcr7</i>	7-dehydrocholesterol reductase	1.45	1.04
1367839_at	<i>Fdft1</i>	farnesyl diphosphate farnesyl transferase 1	1.06	1.01
1373144_at	<i>Fdps</i>	farnesyl diphosphate synthase	1.13	0.99
1386990_at	<i>Ebp</i>	phenylalkylamine Ca <sup>2+</sup> antagonist (emopamil) binding protein	1.03	0.97
1367667_at	<i>Fdps</i>	farnesyl diphosphate synthase	0.94	0.92
1367767_at	<i>Hmgcl</i>	3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA lyase	1.08	0.89

<sup>a</sup> Fold changes compared with control group.

Table 2.8 Selected up-regulated genes by dietary AP in livers of rats fed high cholesterol diet

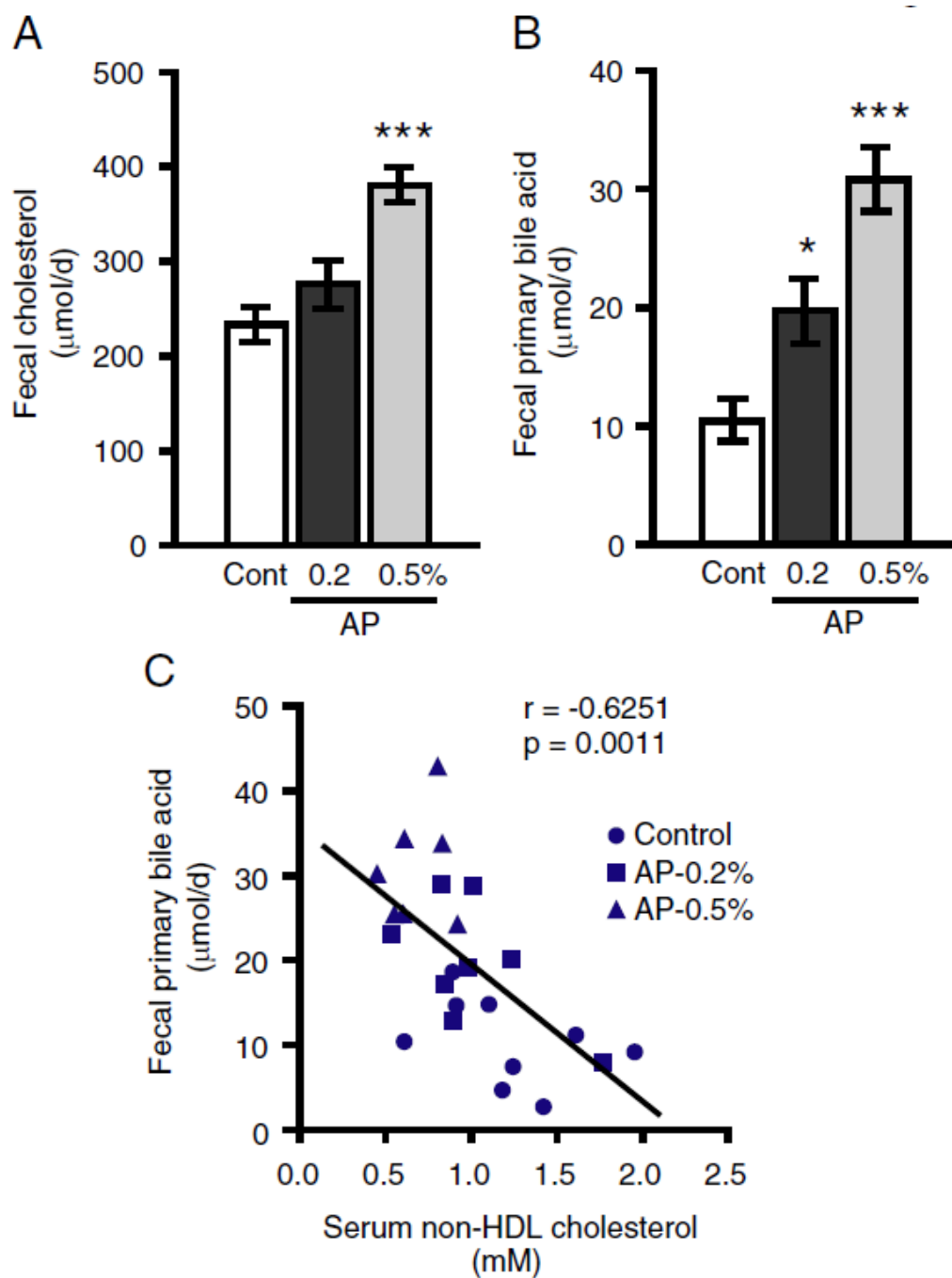
Affymetrix ID	Common name	Description	Fold change <sup>a</sup>	
			AP-0.2	AP-0.5
1371034_at	<i>Hnf6</i>	one cut domain, family member 1 (HNF-6)	1.64	2.31
1387760_at	<i>Hnf6</i>	one cut domain, family member 1 (HNF-6)	1.66	1.91
1368711_at	<i>Hnf3b</i>	forkhead box A2 (FOXA2, HNF-3β)	1.41	1.86
1393902_at	-	aldo-keto reductase family 1, member C6 (17β-hydroxysteroid dehydrogenase)	1.43	1.82
1371076_at	<i>Cyp2b15</i>	cytochrome P450, 2b19 (Steroid 17α-hydroxylase)	1.28	1.65

<sup>a</sup> Fold changes compared with control group.



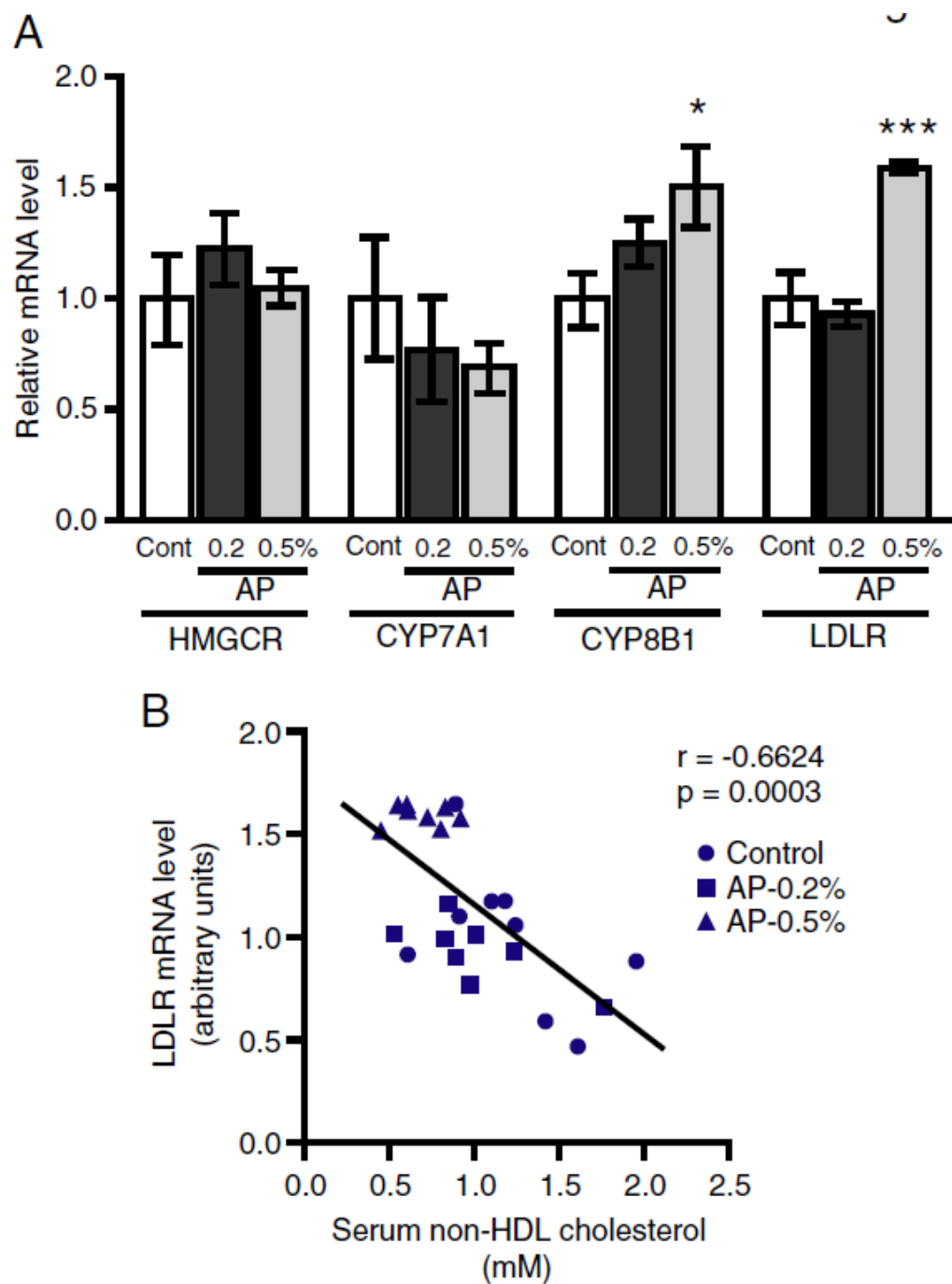
**Fig. 2.1** Effects of dietary apple polyphenols (AP) on cholesterol levels.

Hepatic cholesterol (**A**), serum cholesterol (**B**), and serum non-HDL cholesterol (**C**) levels in rats fed the high cholesterol diet. Values are mean  $\pm$  SEM,  $n = 8\sim 9$ . Different from the control group, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ .



**Fig. 2.2** Effects of dietary AP on fecal steroid levels.

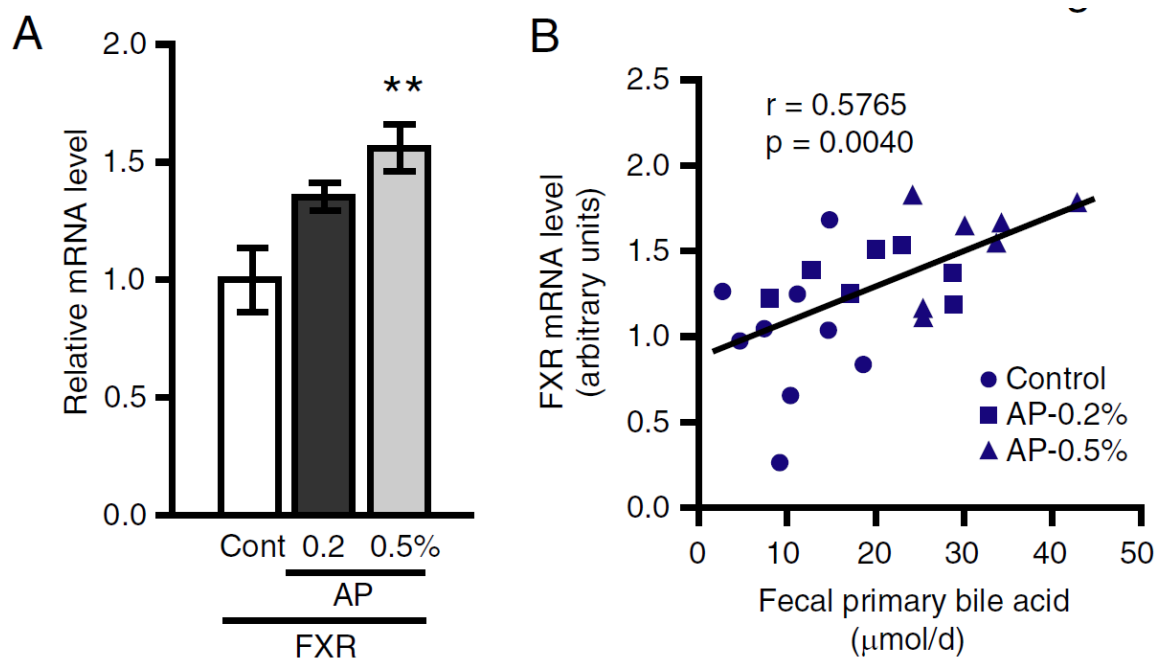
Fecal cholesterol (**A**) and primary bile acids (**B**) amounts in rats fed the high cholesterol diet. Values are mean  $\pm$  SEM,  $n = 8\sim 9$ . Different from the control group, \* $P < 0.05$ , \*\*\* $P < 0.0001$ . **C**, Correlation between serum non-HDL cholesterol and fecal primary bile acids.



**Fig. 2.3** Effects of dietary AP on expression of steroid metabolism genes.

**A**, Expression levels of steroid metabolism genes in livers of rats fed the high cholesterol diet. Values are mean  $\pm$  SEM,  $n = 8\sim 9$ . Different from the control group,  $*P < 0.05$ ,  $***P < 0.0001$ . **B**, Correlation between serum non-HDL cholesterol and LDLR mRNA.





**Fig. 2.4** Effects of dietary AP on expression of FXR.

**A**, Expression levels of FXR in livers of rats fed the high cholesterol diet. Values are mean  $\pm$  SEM,  $n = 8\sim 9$ . \*\*Different from the control group,  $P < 0.01$ . **B**, Correlation between fecal primary bile acids and FXR mRNA.

## 第 3 章

### リンゴポリフェノールのアミロイド $\beta$ タンパク質の凝集体形成

### および神経細胞の毒性に対する影響

#### 3.1 緒言

本論文の第 2 章では、リンゴポリフェノール(AP)の生活習慣病に対する影響を検証するため、コレステロール負荷ラットにおける AP のコレステロール値および肝臓遺伝子発現への影響について検討した。AP の摂取は、LDL 受容体およびステロイド代謝の発現上昇を促進して血中のコレステロール値改善に寄与することが示唆された。これまで AP は抗がん、抗アレルギーの生理機能を有することが報告されているが<sup>(1,2)</sup>、抗老化機能についての報告はなかった。

アルツハイマー病(Alzheimer's disease, AD)は、加齢にともない発症する代表的な疾患のひとつで、記憶障害をともなう進行的な神経変性疾患である。AD は、海馬および大脳皮質に沈着する老人斑とよばれるアミロイド  $\beta$  タンパク質(A $\beta$ )の蓄積によって診断される<sup>(1)</sup>。42 個のアミノ酸から成る A $\beta$ 42 は老人斑を構成する主要な分子であり、それ自身が強く凝集し不溶化することで *in vitro* での神経毒性に関与する<sup>(2)</sup>。数種のポリフェノールは、A $\beta$  の蓄積を軽減することが知られている<sup>(3-5)</sup>。

本章では、AP が神経変性疾患に対する予防機能を有するかどうかについて検証するため、A $\beta$  凝集体形成および神経細胞への毒性に対する AP の影響について検討した。

#### 3.2 材料および方法

##### 3.2.1 試薬

AP、リンゴ由来プロシアニジン類(PC)および AP モノマー画分の調製方法、および分析方法は第 2 章で述べたように、リンゴ(*Malus pumila* Mill. cv. Fuji)の幼果から調製した。PC は AP の 63.8%を占めた。A $\beta$ 42 は、ペプチド研究所から購入した。

##### 3.2.2 チオフラビン-T 蛍光試験

A $\beta$ 42 の凝集度は、凝集した A $\beta$  との結合により蛍光が増大する色素チオフラビン-T(Th-T)を用いる試験によって評価した<sup>(5)</sup>。種々の濃度の被検試料を A $\beta$ 42(終濃度 20  $\mu$ mol/L)と混合して、100 mmol/L NaCl を含む 50 mmol/L Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> バッファー(pH 7.4)溶液内で 6~48 h、37°C でインキュベートして凝集させた。ポリフェノール処理による凝集体解離活性の評価では、A $\beta$ 42(終濃度 20  $\mu$ mol/L)を 48 h、37°C でインキュベートして凝集させたのち、種々の濃度のポリフェノールを添加して、0.5~5 h、室温でインキュベートした。インキュベート後の試料液は、測定まで -80°C で保存した。50 mmol/L のグリシン-NaOH バッファー(pH 8.5)に溶解した Th-T(終濃度 5  $\mu$ mol/L, Sigma-Aldrich)を、試料液へ添加して、0.5h、室温でインキュベートした。蛍光強度の測定は、SPECTRA max GEMINI XS fluorescence microplate reader (Molecular Devices)を用いた。蛍光強度は、励起波長 442 nm、蛍光波長 485 nm で測定した。A $\beta$  凝集阻害度(%)は、ポリフェノール試料無添加の A $\beta$ 42 のみの蛍光強度に対して計算した。

### 3.2.3 アミロイド $\beta$ 凝集体の分離

ポリフェノール試料(100  $\mu$ g/mL の AP、65  $\mu$ g/mL の PC、および 35  $\mu$ g/mL のモノマー画分(monomers, MN))を A $\beta$ 42(終濃度 20  $\mu$ mol/L)と混合し、既報の方法と同様に 24 h インキュベートした<sup>(5)</sup>。反応液 300  $\mu$ L を 20,000 $\times$ g、0.5 h、4°C で遠心分離した。A $\beta$  の沈殿物を、室温で風乾し、SZX9 microscope(OLYMPUS)で 12.5 倍の倍率で撮影した。沈殿物を 6 mol/L グアニジン-塩酸塩(pH 4.5~7.5, Sigma-Aldrich)に溶解し、0.1%(w/v)ドデシル硫酸ナトリウム(SDS, Sigma-Aldrich)を含む RIPA バッファーで 15 倍に希釈した。A $\beta$  濃度を、DC protein assay kit(Bio-Rad)で測定した。遠心上清を 1%(w/v) SDS、50 mmol/L ジチオスレイトールを含む EzApply solution(ATTO)と混合し、85°C、2 min で変性させ、Tris-グリシンバッファー中 20%(w/v)ポリアクリルアミドゲルにて 25 mA で電気泳動分離した(SDS-PAGE)。Coomassie brilliant blue 染色法(Quick-CBB, 和光純薬工業)を用いて、上清中の A $\beta$  を検出した。

### 3.2.4 細胞生存試験

PC-12 細胞(RCB0009, RIKEN BioResource Center)を神経細胞モデルとして用い、A $\beta$  の毒性を評価した<sup>(6)</sup>。詳細な方法は既報に従った<sup>(5)</sup>。はじめに、PC-12 細胞( $2 \times 10^4$  個/ウェル)を 16 h、37°C でインキュベートし、フィルター除菌した種々の濃度のポリフェノールを添加して 1 h インキュベートしたのち、1  $\mu$ mol/L の A $\beta$ 42 を添加して 36 h 培養した。その後、thiazolyl blue tetrazolium bromide(MTT, 終濃度 0.5 mg/mL, Sigma-Aldrich)を添加し、4 h、37°C で処理した。その後、SDS で可溶化したのち、生細胞による MTT の還元に伴い生成する不溶性ホルマザン色素の呈色を、VersaMax microplate reader (Molecular Devices)を用いて波長 570 nm の吸光度を計測することで

算出した。A $\beta$ 42 のみの試験群を対照として生存率(%)を算出した。

### 3.2.5 統計解析

統計解析は、SPSS v11.5 ソフトウェアを使用した。試験群間の平均値比較は、Student's *t*-test 法を用いた。試験群間の多重比較は、分散分析 (ANOVA) によって行った。その後の検定として Dunnett 法を用いた<sup>(7)</sup>。

## 3.3 結果

### 3.3.1 リンゴポリフェノールによる *in vitro* の A $\beta$ 凝集体形成への影響

AP による A $\beta$  凝集性への影響を調べるために、A $\beta$ 42 に対するチオフラビン-T 蛍光検出試験を行った。Fig. 3.1 に示すように、AP および PC 無添加の場合には、A $\beta$ 42 (20  $\mu$ mol/L) は 48 h インキュベーションにより Th-T と結合する凝集物が形成し蛍光強度が増大したが、AP および PC の添加は用量依存的に顕著に蛍光強度を減少させた(Fig. 3.1A)。さらに、100  $\mu$ g/mL の AP、および 32.5  $\mu$ g/mL の PC は、A $\beta$  の凝集を完全に阻害したが(図中の ns は 0 h と比べて有意差はないことを示す( $P > 0.01$ )), MN は部分的な減少にとどまった(Fig. 3.1A)。PC は AP 中に約 65%含まれており、32.5  $\mu$ g/mL の PC による効果が 100  $\mu$ g/mL の AP と一致したことから、PC は AP と比べて約 2 倍の A $\beta$  凝集抑制活性を有すると示唆された。ラットで用量 1,000 mg/kg-体重の経口摂取における生体吸収量(血漿中 11.5  $\mu$ g/mL)のレベルは<sup>(8)</sup>、A $\beta$  の凝集を有意に抑制する濃度であった(Fig. 3.1B)。さらに、低濃度の AP および PC(1.00 および 0.65  $\mu$ g/mL)でも有意に凝集を抑制したが、0.35  $\mu$ g/mL の MN ではいずれの反応時間においても凝集は抑制されなかった(Fig. 3.1C)。Fig. 3.1 の結果は、PC はエピカテキンおよびカテキンを含む MN 画分とは対照的に、A $\beta$  の凝集を抑制することを示唆した。

つぎに、AP が Th-T の蛍光強度に直接的に影響を与えた可能性を除くため<sup>(9)</sup>、遠心分離によってアミロイドの凝集体と単量体を分離する方法で、AP の凝集抑制効果を確認した(Fig. 3.2)。A $\beta$  (20  $\mu$ mol/L)の 48 h インキュベートにより凝集体が観察された(Fig. 3.2A; vehicle)。100  $\mu$ g/mL の AP、および 65  $\mu$ g/mL の PC の添加は、A $\beta$  の凝集を完全に阻害したが、35  $\mu$ g/mL の MN は阻害しなかった(Fig. 3.2A)。遠心分離上清の SDS-PAGE により、単量体 A $\beta$  を 100  $\mu$ g/mL の AP、および 65  $\mu$ g/mL の PC 添加群で検出した(Fig. 3.2B)。凝集体と上清のタンパク質濃度は、vehicle では凝集体側に全体のタンパク質のうち 78%が存在していたが、AP 添加群では凝集体側にタンパク質が検出されず、PC 添加群では凝集体側に5%しか存在していなかった(Fig. 3.2C)。Fig. 3.2 の

結果は、100  $\mu\text{g/mL}$  の AP、および 65  $\mu\text{g/mL}$  の PC の添加は、A $\beta$  の凝集を 15 倍以上で顕著に阻害することを示す。以上の結果から、AP および PC は *in vitro* でアミロイド凝集体の形成を強力に阻害することが明らかとなった。

### 3.3.2 リンゴポリフェノールによる A $\beta$ 凝集体の解離への影響

AP が A $\beta$ 42 の凝集体を解離するかどうかを確認するため、凝集体形成後にポリフェノール処理を行い、Th-T 試験を実施した。A $\beta$ 42 (20  $\mu\text{mol/L}$ ) の 48 h インキュベート後、種々の濃度の AP、PC、および MN を添加して、さらに 0.5 h インキュベートを行った。Fig. 3.3 に示すように、PC は用量依存的に(65~650  $\mu\text{g/mL}$ ) A $\beta$ 42 の凝集体を解離したが、AP の効果は PC と比べて限定的であった (Fig. 3.3A)。一方、360  $\mu\text{g/mL}$  の MN では、A $\beta$  凝集体の解離は認められなかった (Fig. 3.3A, B)。加えて、AP および PC の添加は 0.5 h のインキュベートで有意に凝集体を解離し、その解離は添加後 5 h まで継続した (Fig. 3.3B)。データは示さないが、50  $\mu\text{g/mL}$  の AP、および 32.5  $\mu\text{g/mL}$  の PC では、A $\beta$  凝集体の解離は認められなかった。このことから、AP および PC が凝集体を解離させるためには、前項 3.3.1 の凝集体形成抑制と比べて、高濃度を必要とすることが示唆された。

### 3.3.3 リンゴポリフェノールによる A $\beta$ 42 誘導性神経毒性への影響

A $\beta$ 42 は、高い凝集体形成能と神経毒性から、AD の発症に重要な役割を果たす<sup>(10)</sup>。PC-12 細胞は、A $\beta$  処理による細胞毒性を評価するために樹立された細胞株である<sup>(11)</sup>。A $\beta$ 42 誘導性神経毒性に対して AP が保護するかどうか調べるために、この細胞株の生存率を MTT 法を用いて評価した<sup>(12)</sup>。A $\beta$ 42 (1  $\mu\text{mol/L}$ ) の細胞への添加は、36 h のインキュベートにより細胞毒性を誘導した (生存率は  $23.7 \pm 2.4\%$ , Fig. 3.4A)。PC-12 細胞を AP および PC とまず 1 h インキュベートしたのち、A $\beta$ 42 を 36 h 処理したところ、AP および PC は用量依存的に有意に細胞毒性を抑制した (Fig. 3.4A)。32.5  $\mu\text{g/mL}$  の PC は、細胞毒性を完全に相殺した (生存率は  $101.2 \pm 5.6\%$ , Fig. 3.4A)。100  $\mu\text{g/mL}$  の AP は、細胞生存率を有意に回復した (生存率  $88.0 \pm 13.7\%$ , Fig. 3.4A)。さらに、AP および PC のみ添加し (A $\beta$ 42 を添加しない) 36 h 処理した場合、100  $\mu\text{g/mL}$  の AP、および 32.5  $\mu\text{g/mL}$  の PC で生存率を上昇させた (Fig. 3.4B)。以上の結果から、AP および PC は A $\beta$ 42 誘導性細胞毒性を保護することが明らかとなった。

## 3.4 考察

植物から抽出したポリフェノールは、*in vitro* における抗凝集活性、抗神経細胞毒性活性を示

すことが報告されているが<sup>(13)</sup>、AP がこれらの機能を有するかどうかは明らかでなかった。通常ポリフェノールは生体利用性(bioavailability)が小さく、とくに PC のような高分子であてはまることが知られている<sup>(14,15)</sup>。他方で、数種のポリフェノールの長期投与は、AD モデルマウスの AD 様病変および記憶障害に対して軽減作用を有することが報告されている<sup>(3,16,17)</sup>。また、マリアアザミ(*Silybum marianum*)種子から抽出されたシリマリンの経口摂取によって AD モデルマウスの AD 様表現型を軽減することが示された<sup>(5)</sup>(シリマリン中の主要なポリフェノール成分であるタキシフォリンの構造を Fig. 3.5A に示した)。本研究は、PC が A $\beta$  凝集および神経毒性を 50%阻害濃度(IC<sub>50</sub>)がそれぞれ 4.8  $\mu$ g/mL および 9.4  $\mu$ g/mL で阻害することを示し(Fig. 3.1, 3.4)、PC が少なくとも *in vitro* で凝集体形成を防ぐことを示した。一方、PC の生体利用性については、PC を特異的に定量する Porter 法および HPLC/タンデム MS 解析により、ラットで AP 1,000 mg/kg-体重の単回摂取 2 時間後に血漿中に 11.4  $\mu$ g/mL の PC を検出している<sup>(8)</sup>。以上より、AP の血中濃度と A $\beta$  抗凝集活性濃度とは少なくとも同等レベルであると考えられる。PC の *in vivo* での AD 様病変および記憶障害に対する影響について、今後検証する必要がある。

Fig. 3.1 で、A $\beta$  凝集性を評価した Th-T 試験より、AP の 90%阻害濃度(IC<sub>90</sub>)は 87.8  $\mu$ g/mL であるのに対して、PC の IC<sub>90</sub> は 24.7  $\mu$ g/mL となり、これは 38.0  $\mu$ g/mL の AP に相当する量であった(Fig. 3.1A)。従って、A $\beta$  の凝集に対する PC の阻害活性は AP より約 2 倍高いことが示された。さらに、AP の凝集体解離活性は、100  $\mu$ g/mL で飽和状態となったが、PC の活性は 240  $\mu$ g/mL まで上昇し続けた(Fig. 3.3A)。AP の凝集体解離活性の上昇傾向は、MTT 法による細胞生存率評価でも同様であったことから(Fig. 3.4)、PC は A $\beta$  凝集体の解離活性、および神経細胞保護活性が、複合物である AP よりも高いことが確認された。また、MN の凝集体抑制活性は限定的であった。これらの結果より、PC 画分が凝集を抑制する主成分であり、MN は PC の凝集体抑制活性、および神経細胞保護活性を相殺する成分を含む可能性が考えられた。

A $\beta$  凝集の原因となる分子間の  $\beta$  シート線維構造形成には、アミノ酸残基の Gln<sup>15</sup>~Ala<sup>21</sup> および Val<sup>24</sup>~Ile<sup>32</sup> 領域が関与すると推定されている<sup>(18,19)</sup>。さらに、 $\beta$  シート形成には、酸化ストレスが関与することが報告されている<sup>(18,19)</sup>。前述したように、抗酸化活性を有するエピカテキン、カテキンを含む MN 画分は、PC と比べて凝集抑制活性が限定的であった。また、強力な抗酸化活性を有するビタミン C (2 mmol/L, 分子構造を Fig. 3.5D に示す)および SOD 模倣化合物である EUK-134 (40  $\mu$ mol/L, 分子構造を Fig. 3.5E に示す)は、A $\beta$  凝集体形成を抑制しないことを確認した(未発表、詳細省略)。このことから、本研究での *in vitro* における A $\beta$  凝集抑制活性評価系において、化合物が有する抗酸化能は活性におよぼす影響が小さいことが示唆された。同様に、Yatin らは抗酸化ビタミンであるビタミン E (VE, 分子構造を Fig. 3.5F に示す)は A $\beta$ 42 凝集を抑制しないと報告したが<sup>(20)</sup>、Yang らは VE から変換される  $\alpha$ -トコフェロールキノン(分子構造を Fig. 3.5G に示す)は用

量依存的に A $\beta$  凝集を抑制すると報告した<sup>(21)</sup>。このことから、*in vitro* での A $\beta$  凝集抑制活性は、その分子の有する抗酸化活性よりも分子構造に大きく依存されることが示唆された。

PC を含むフラボノイド類ポリフェノールとタンパク質とは、種々の様式により相互作用することが知られている<sup>(22)</sup>。その機構は共有結合性と非共有結合性に分類され、共有結合性のものはフラボノイドの酸化体であるキノン体と、タンパク質アミノ酸残基のアミド基との共有結合による<sup>(22)</sup>。他方、非共有結合性のうち特異性のある相互作用として、ポリフェノールの芳香環とアミノ酸のフェニル基による  $\pi/\pi$ -スタッキングとよばれるファンデルワールス力による相互作用や、ポリフェノールとアミノ酸のヒドロキシル基同士による水素結合が挙げられる<sup>(22)</sup>。そのため、ポリフェノールによる A $\beta$  凝集抑制活性の分子機構は、ポリフェノールと A $\beta$  タンパク質との共有結合性または／かつ非共有結合性の相互作用により、A $\beta$  の  $\beta$  シート形成を抑制することにより発現すると考えられる。ポリフェノールによる A $\beta$  凝集体形成抑制の分子機構については、数種の報告がある<sup>(23-28)</sup>。Hirohata らは、フラボノイド類のうちフラボノール類のミリセチン(分子構造を Fig. 3.5B に示した)は、*in vitro* で A $\beta$  の線維構造に対して可逆的結合をすることで、アミロイド凝集体形成の阻害作用を示すと報告した<sup>(23)</sup>。Wang らは、*trans*-レスベラトロールは Arg<sup>11</sup> 残基が相互作用に参与していることを示した<sup>(24)</sup>。Kirschner らは、クルクミン(分子構造を Fig. 3.5C に示した)が A $\beta$ 42 の Glu<sup>11</sup>~Gly<sup>25</sup> 領域に水素結合することにより、凝集を抑制すると報告した<sup>(25)</sup>。また、Kumar らは NMR 構造解析により A $\beta$ 42 の Gln<sup>15</sup>、Glu<sup>22</sup> および Asp<sup>23</sup> 残基にクルクミンが結合すると報告し<sup>(26)</sup>、Masuda らは NMR 構造解析により A $\beta$ 42 の Phe<sup>19</sup>、Phe<sup>20</sup> 残基と  $\pi/\pi$ -スタッキングによりクルクミンが相互作用して凝集を抑制すると報告した<sup>(27)</sup>。さらに Sato らは、シリマリンに含まれるフラボノイド類のうちフラバノール類のタキシフォリンが有する A $\beta$  凝集抑制活性の分子機構について詳細に報告している<sup>(28)</sup>。まず、タキシフォリン(Fig. 3.5A)が有するカテコール構造が生体内で自動酸化により *o*-キノン体へ変換されることが凝集抑制活性の発現に重要であることを示した<sup>(28)</sup>。つぎに、LC-MS 解析により酸化されたタキシフォリンのキノン体は、A $\beta$  の Lys<sup>16</sup> および Lys<sup>28</sup> 残基とマイケル付加体を形成することにより、 $\beta$  シート形成抑制活性を発現していることを示した<sup>(28)</sup>。さらに、各種フラバノール類およびフラボノール類ポリフェノールの凝集抑制活性比較により、B 環 3',4'位がヒドロキシル基のカテコール構造が、Lys との共有結合による凝集抑制活性に重要であることを示した<sup>(28)</sup>。カテコール構造を有するフラボノイド類は、生体血中のような高 pH の状況でキノン体へ自動酸化されやすいことが知られている<sup>(22)</sup>。PC はタキシフォリンと同様に、B 環の 3',4'位がヒドロキシル基であるカテコール構造を、分子内に複数有している。筆者らは、PC を A $\beta$ 42 の凝集体に対して添加したときに、PC が呈する色と同様な橙～褐色の沈殿物を形成することを観察している(未発表、詳細省略)。このことは、A $\beta$ 42 凝集体に対して PC が結合することを示しており、強力な相互作用を有していることを示している。以上の結果および考察より、PC はそのキノン体が、分子間  $\beta$  シート形成

に關与する Lys 残基との共有結合を形成することにより、強力な凝集抑制活性が発現した可能性が考えられた。一方、上述のように非カテコール型のポリフェノールも A $\beta$  との  $\pi/\pi$ -スタッキングや水素結合による相互作用が報告されているため、複数の芳香環とヒドロキシル基を有する PC は、非共有結合型の相互作用も形成している可能性が考えられた。PC の凝集抑制活性については、キノン体の關与や PC-A $\beta$  の構造解析による相互作用様式を明らかにしていく必要がある。また、本研究では、PC がタンパク質との相互作用性が高いことが示され、その相互作用は構造特異的なものであることが示唆された。PC は、重合度特異的なリパーゼ阻害活性を有することが報告されており<sup>(29)</sup>、リパーゼとの相互作用によるものと推察される。PC は生体内でタンパク質と相互作用をすることによって、タンパク質凝集毒性の緩和以外にも、種々の酵素活性に影響を与える可能性が示唆された。

Fig. 3.4A では PC は用量依存的に神経保護作用を示し、PC が A $\beta$  凝集体抑制作用と細胞生存性の両者の役割を有することを示した。加えて、PC の凝集抑制効果、および神経保護効果は MN だけでなく AP と比べても強いことから、PC の A $\beta$ 42 凝集抑制効果が神経保護効果へと寄与すると示唆された。本研究では、PC の細胞生存率へのさらなる効果が確認された。PC(32.5  $\mu\text{g/mL}$ )、および AP(100  $\mu\text{g/mL}$ )処理した PC-12 細胞(A $\beta$  添加なし)は、生存率が有意に増大した。Miura らは、低用量の PC は細胞分化を促進し、一方、高用量の PC はメラノーマ細胞のアポトーシスを誘導することを示した<sup>(30)</sup>。Choi らは、PC 処理は内在性ヒストンアセチルトランスフェラーゼ活性を阻害し、細胞増殖を抑制することで、前立腺癌細胞の細胞死を増加させると報告した<sup>(31)</sup>。これらの結果は、PC が用量依存的に細胞増殖を制御することを示唆する。PC は A $\beta$  凝集の抑制だけでなく、神経細胞の分化を調節することにより、A $\beta$  誘導性の毒性に対して神経保護効果を示す可能性が示唆された。

結論として、AP は *in vitro* で異常な A $\beta$  凝集形成に対して強力な抑制効果を有し、神経細胞の生存に保護効果を示すことが明らかとなった。AP は安全性が確認された食物因子であるため<sup>(32)</sup>、長期摂取に有望と判断される。本章で明らかにした AP の新しい機能は、神経変性疾患に関連した A $\beta$  凝集に対する、予防および治療への可能性を示唆した。

### 3.5 要約

脳の老化にともない進行する神経変性疾患のアルツハイマー病において、その原因となるアミロイド  $\beta$  タンパク質(A $\beta$ )凝集体形成に対する AP の影響を解析した。Th-T 蛍光検出による A $\beta$ 42 凝集性に対して、AP および PC の添加は用量依存的に凝集度を減少させた。100  $\mu\text{g/mL}$  の AP、



および 32.5  $\mu\text{g/mL}$  の PC は、 $\text{A}\beta$  の凝集を完全に阻害したが、MN は部分的な減少にとどまった。PC は AP と比べて約 2 倍の  $\text{A}\beta$  凝集抑制作用を有すると示唆された。低濃度の AP および PC (1.00 および 0.65  $\mu\text{g/mL}$ ) は有意に凝集を抑制したが、0.35  $\mu\text{g/mL}$  の MN では凝集抑制作用は認められなかった。遠心分離によってアミロイドの凝集体と単量体を分離する方法により PC の凝集抑制作用を確認したところ、100  $\mu\text{g/mL}$  の AP、および 65  $\mu\text{g/mL}$  の PC の添加は凝集を完全に阻害したが、35  $\mu\text{g/mL}$  の MN は阻害しなかった。PC が  $\text{A}\beta_{42}$  の凝集体を解離するかどうか確認するため、凝集体形成後にポリフェノール処理を行い、Th-T 試験を実施したところ、PC は用量依存的に  $\text{A}\beta_{42}$  の凝集体を解離したが、AP の効果は PC と比べて限定的であった。MN では、 $\text{A}\beta$  凝集体の解離は認められなかった。AP および PC は *in vitro* でアミロイド凝集体の形成を強力に阻害することが明らかとなった。神経細胞株である PC-12 細胞を AP および PC とインキュベートしたのち、 $\text{A}\beta_{42}$  処理したところ、AP および PC は用量依存的に有意に細胞毒性を抑制した。32.5  $\mu\text{g/mL}$  の PC は細胞毒性を完全に相殺し、100  $\mu\text{g/mL}$  の AP は細胞生存率を有意に回復した。AP および PC は  $\text{A}\beta_{42}$  誘導性細胞毒性を保護することが明らかとなった。

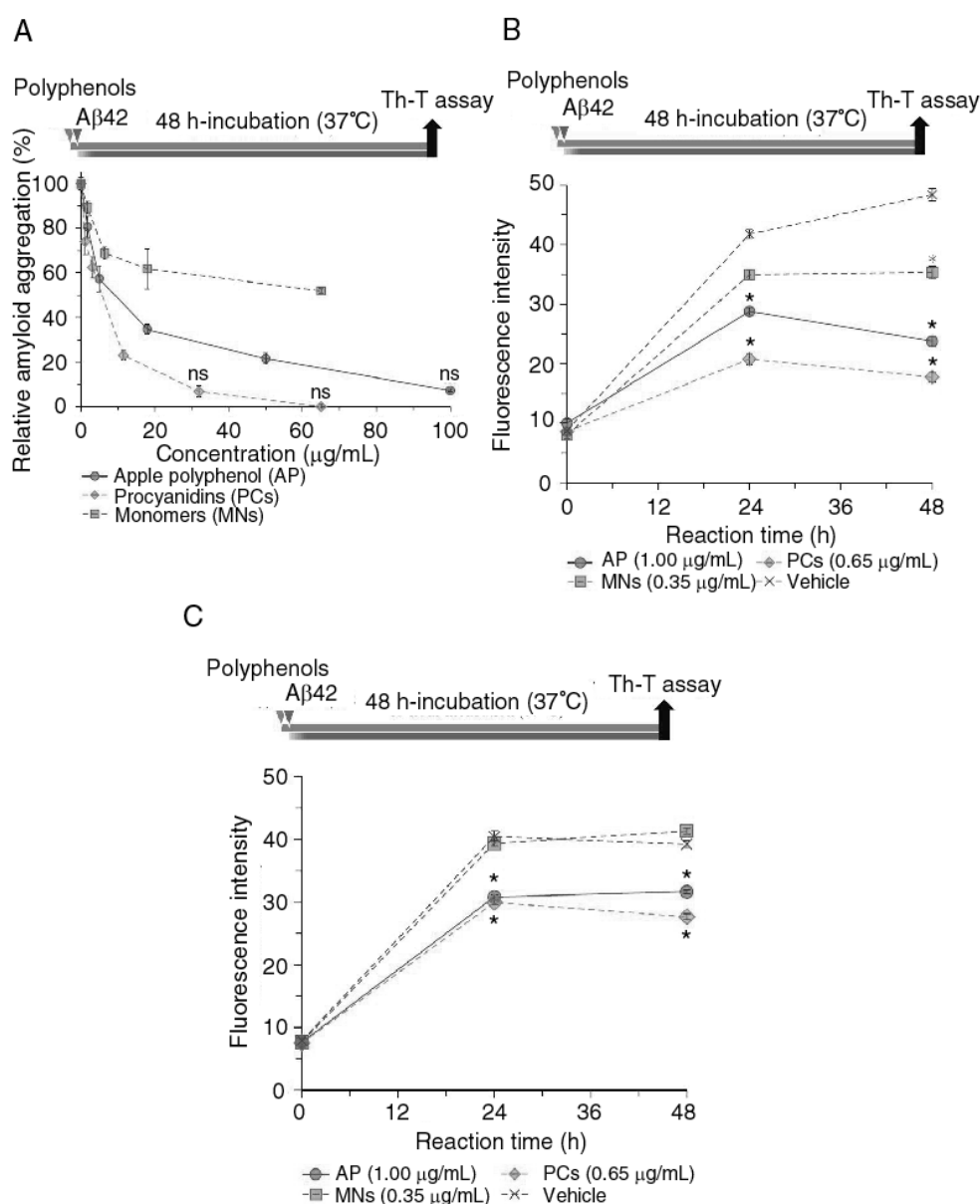
以上より、本章では、*in vitro* ならびに培養細胞に対して AP は用量依存的に  $\text{A}\beta$  の凝集を抑制し、 $\text{A}\beta$  による細胞毒性を抑制することを確認した。AP は老化予防および治療機能を有する可能性が示唆された。

### 3.6 参考文献

1. Selkoe, D.J. Developing preventive therapies for chronic diseases: lessons learned from Alzheimer's disease. *Nutr Rev.* **65**, S239-243 (2007)
2. Murakami, K., Irie, K., Morimoto, A., Ohigashi, H., Shindo, M., Nagao, M., Shimizu, T., Shirasawa, T. Neurotoxicity and physicochemical properties of Abeta mutant peptides from cerebral amyloid angiopathy: implication for the pathogenesis of cerebral amyloid angiopathy and Alzheimer's disease. *J Biol Chem.* **278**, 46179-46187 (2003)
3. Lim, G.P., Chu, T., Yang, F., Beech, W., Frautschy, S.A., Cole, G.M. The curry spice curcumin reduces oxidative damage and amyloid pathology in an Alzheimer transgenic mouse. *J Neurosci.* **21**, 8370-8377 (2001)
4. Hamaguchi, T., Ono, K., Murase, A., Yamada, M. Phenolic compounds prevent Alzheimer's pathology through different effects on the amyloid-beta aggregation pathway. *Am J Pathol.* **175**, 2557-2565 (2009)
5. Murata, N., Murakami, K., Ozawa, Y., Kinoshita, N., Irie, K., Shirasawa, T., Shimizu, T. Silymarin attenuated the amyloid  $\beta$  plaque burden and improved behavioral abnormalities in an Alzheimer's disease mouse model. *Biosci Biotechnol Biochem.* **74**, 2299-2306 (2010)
6. Shearman, M.S., Ragan, C.I., Iversen, L.L. Inhibition of PC12 cell redox activity is a specific, early indicator of the mechanism of beta-amyloid-mediated cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A*

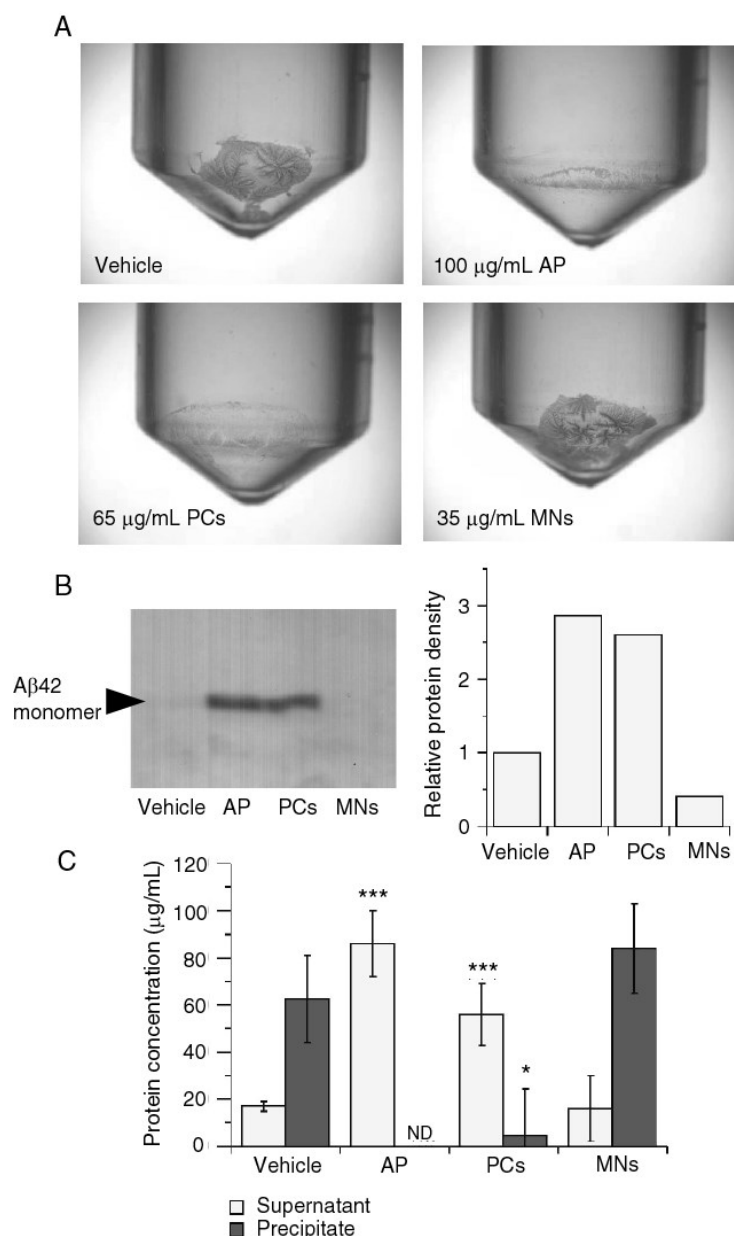
- A. **91**, 1470-1474 (1994)
7. Ludbrook, J. Multiple comparison procedures updated. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* **25**, 1032-1037 (1998)
  8. Shoji, T., Masumoto, S., Moriichi, N., Akiyama, H., Kanda, T., Ohtake, Y., Goda, Y. Apple procyanidin oligomers absorption in rats after oral administration: analysis of procyanidins in plasma using the porter method and high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *J Agric Food Chem.* **54**, 884-892 (2006)
  9. Hudson, S.A., Ecroyd, H., Kee, T.W., Carver, J.A. The thioflavin T fluorescence assay for amyloid fibril detection can be biased by the presence of exogenous compounds. *FEBS J.* **276**, 5960-5972 (2009)
  10. Murakami, K., Masuda, Y., Shirasawa, T., Shimizu, T., Irie, K. The turn formation at positions 22 and 23 in the 42-mer amyloid  $\beta$  peptide: The emerging role in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Geriatr Gerontol Int.* **10 Suppl 1**, S169-179 (2010)
  11. Refolo, L.M., Salton, S.R.J., Anderson, J.P., Mehta, P., Robakis, N.K. Nerve and epidermal growth factors induce the release of the Alzheimer Amyloid precursor from PC 12 cell cultures. *Biochem Biophys Res Commun.* **164**, 664-670 (1989)
  12. Behl, C., Davis, J.B., Lesley, R., Schubert, D. Hydrogen peroxide mediates amyloid  $\beta$  protein toxicity. *Cell.* **77**, 817-827 (1994)
  13. Ho, L., Pasinetti, G.M. Polyphenolic compounds for treating neurodegenerative disorders involving protein misfolding. *Expert Rev Proteomics.* **7**, 579-589 (2010)
  14. Williamson, G., Manach, C. Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. II. Review of 93 intervention studies. *Am J Clin Nutr.* **81**, 243S-255S (2005)
  15. Appeldoorn, M.M., Vincken, J.P., Gruppen, H., Hollman, P.C.H. Procyanidin dimers A1, A2, and B2 are absorbed without conjugation or methylation from the small intestine of rats. *J Nutr.* **139**, 1469-1473 (2009)
  16. Stackman, R.W., Eckenstein, F., Frei, B., Kulhanek, D., Nowlin, J., Quinn, J.F. Prevention of age-related spatial memory deficits in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease by chronic *Ginkgo biloba* treatment. *Exp Neurol.* **184**, 510-520 (2003)
  17. Wang, J., Ho, L., Zhao, W., Ono, K., Rosensweig, C., Chen, L., Humala, N., Teplow, D.B., Pasinetti, G.M. Grape-derived polyphenolics prevent Abeta oligomerization and attenuate cognitive deterioration in a mouse model of Alzheimer's disease. *J Neurosci.* **28**, 6388-6392 (2008)
  18. Murakami, K., Irie, K., Ohigashi, H., Hara, H., Nagao, M., Shimizu, T., Shirasawa, T. Formation and stabilization model of the 42-mer A $\beta$  radical. Implications for the long-lasting oxidative stress in Alzheimer's disease. *J Am Chem Soc.* **127**, 15168-15174 (2005)
  19. Murakami, K., Murata, N., Noda, Y., Tahara, S., Kaneko, T., Kinoshita, N., Hatsuta, H., Murayama, S., Barnham, K., Irie, K., Shirasawa, T., Shimizu, T. SOD1 (copper/zinc superoxide dismutase) deficiency drives amyloid  $\beta$  protein oligomerization and memory loss in mouse model of Alzheimer disease. *J Biol Chem.* **286**, 44557-44568 (2011)
  20. Yatin, S.M., Varadarajan, S., Butterfield, D.A. Vitamin E prevents Alzheimer's amyloid beta-peptide (1-42)-induced neuronal protein oxidation and reactive oxygen species production. *J Alzheimers Dis.* **2**, 123-131 (2000)
  21. Yang, S.G., Wang, W.Y., Ling, T.J., Feng, Y., Du, X.T., Zhang, X., Sun, X.X., Zhao, M., Xue, D., Yang, Y., Liu, R.T. Alpha-tocopherol quinone inhibits beta-amyloid aggregation and cytotoxicity, disaggregates preformed fibrils and decreases the production of reactive oxygen species, NO and inflammatory cytokines. *Neurochem Int.* **57**, 914-922 (2010)

22. Bordenave, N., Hamaker, B.R., Ferruzzi, M.G. Nature and consequences of non-covalent interactions between flavonoids and macronutrients in foods. *Food Funct.* **5**, 18-34 (2014)
23. Hirohata, M., Hasegawa, K., Tsutsumi-Yasuhara, S., Ohhashi, Y., Ookoshi, T., Ono, K., Yamada, M., Naiki, H. The anti-amyloidogenic effect is exerted against Alzheimer's beta-amyloid fibrils *in vitro* by preferential and reversible binding of flavonoids to the amyloid fibril structure. *Biochemistry.* **46**, 1888-1899 (2007)
24. Wang, Q., Ning, L., Niu, Y., Liu, H., Yao, X. Molecular mechanism of the inhibition and remodeling of human islet amyloid polypeptide (hIAPP1-37) oligomer by resveratrol from molecular dynamics simulation. *J Phys Chem.* **119**, 15-24 (2015)
25. Kirschner, D.A., Gross, A.A., Hidalgo, M.M., Inouye, H., Gleason, K.A., Abdelsayed, G.A., Castillo, G.M., Snow, A.D., Pozo-Ramajo, A., Petty, S.A., Decatur, S.M. Fiber diffraction as a screen for amyloid inhibitors. *Curr Alzheimer Res.* **5**, 288-307 (2008)
26. Kumar, P., Pillay, V., Choonara, Y.E., Modi, G., Naidoo, D., du Toit, L.C. *In Silico* theoretical molecular modeling for Alzheimer's disease: the nicotine-curcumin paradigm in neuroprotection and neurotherapy. *Int J Mol Sci.* **12**, 694-724 (2011)
27. Masuda, Y., Fukuchi, M., Yatagawa, T., Tada, M., Takeda, K., Irie, K., Akagi, K., Monobe, Y., Imazawa, T., Takegoshi, K. Solid-state NMR analysis of interaction sites of curcumin and 42-residue amyloid  $\beta$ -protein fibrils. *Bioorg Med Chem.* **19**, 5967-5974 (2011)
28. Sato, M., Murakami, K., Uno, M., Nakagawa, Y., Katayama, S., Akagi, K., Masuda, Y., Takegoshi, K., Irie, K. Site-specific inhibitory mechanism for amyloid  $\beta$ 42 aggregation by catechol-type flavonoids targeting the Lys residues. *J Biol Chem.* **288**, 23212-23224 (2013)
29. Sugiyama, H., Akazome, Y., Shoji, T., Yamaguchi, A., Yasue, M., Kanda, T., Ohtake, Y. Oligomeric procyanidins in apple polyphenol are main active components for inhibition of pancreatic lipase and triglyceride absorption. *J Agric Food Chem.* **55**, 4604-4609 (2007)
30. Miura, T., Chiba, M., Kasai, K., Nozaka, H., Nakamura, T., Shoji, T., Kanda, T., Ohtake, Y., Sato, T. Apple procyanidins induce tumor cell apoptosis through mitochondrial pathway activation of caspase-3. *Carcinogenesis.* **29**, 585-593 (2008)
31. Choi, K.C., Park, S., Lim, B.J., Seong, A.R., Lee, Y.H., Shiota, M., Yokomizo, A., Naito, S., Na, Y., Yoon, H.G. Procyanidin B3, an inhibitor of histone acetyltransferase, enhances the action of antagonist for prostate cancer cells via inhibition of p300-dependent acetylation of androgen receptor. *Biochem J.* **433**, 235-244 (2010)
32. 神田智正, 庄司俊彦. プロアントシアニン類(縮合型タンニン類), 植物ポリフェノール含有素材の開発-その機能性と安全性. シーエムシー出版, 東京, p.p. 256-264 (2007)



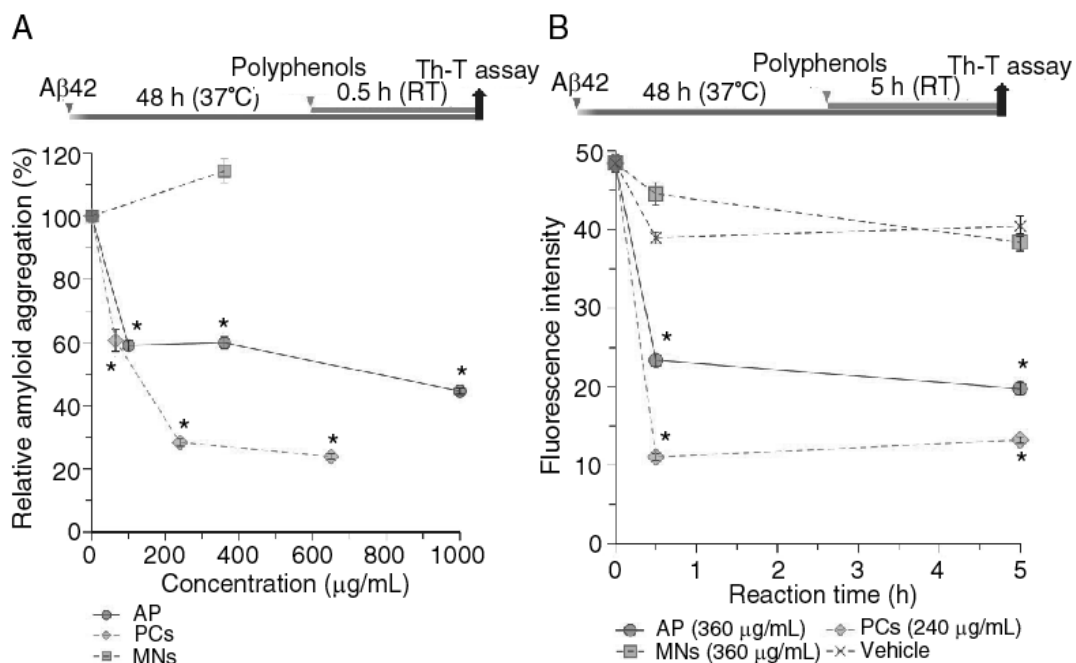
**Fig. 3.1** Apple polyphenols and procyanidins suppress A $\beta$  aggregation *in vitro*.

**A:** Dose-dependent suppression of A $\beta$ 42 aggregation by polyphenols as indicated by thioflavin-T (Th-T) analysis. Various concentrations of apple polyphenol (AP), procyanidins (PCs), and monomers (MNs) were incubated with A $\beta$ 42 (final concentration 20  $\mu$ mol/L) for 48 h. Different from 0 h (baseline), ns; not significant ( $P > 0.01$ ). **B, C:** Time-dependent A $\beta$ 42 aggregation in the presence of polyphenols as indicated by the Th-T assay. **B:** A $\beta$ 42 (20  $\mu$ mol/L) was incubated with AP (18.0  $\mu$ g/mL), PCs (11.5  $\mu$ g/mL), and MNs (6.5  $\mu$ g/mL). **C:** A $\beta$ 42 (20  $\mu$ mol/L) was incubated with AP (1.0  $\mu$ g/mL), PCs (0.65  $\mu$ g/mL), and MNs (0.35  $\mu$ g/mL). Differences compared to vehicle groups,  $*P < 0.001$ . Values are the mean value  $\pm$  SEM,  $n = 5$ .



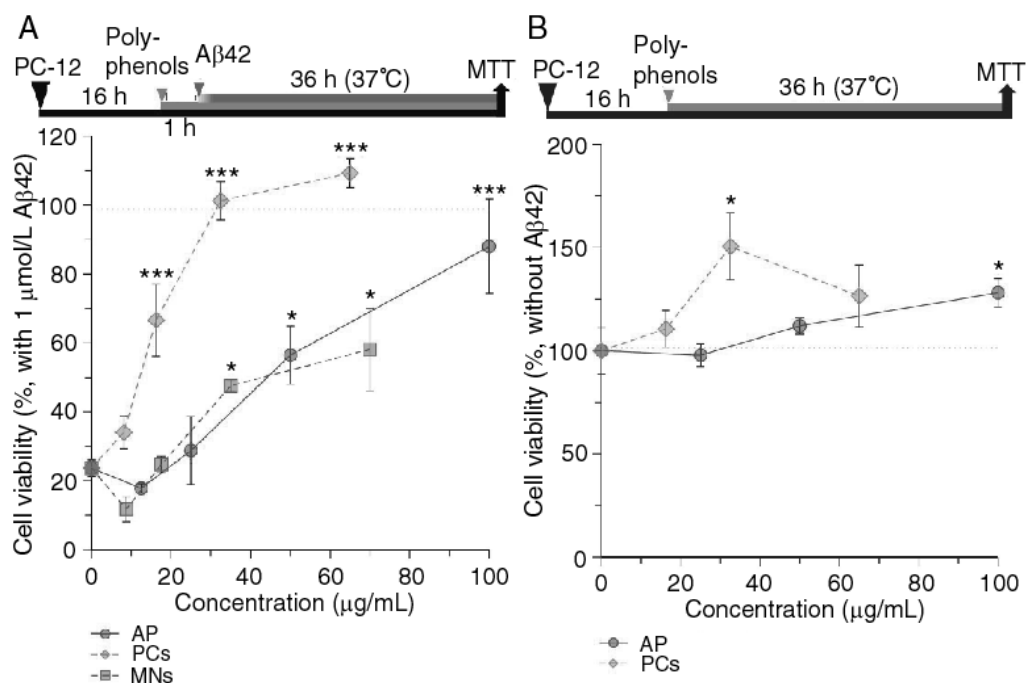
**Fig. 3.2** Apple polyphenols and procyanidins extinguish A $\beta$  precipitation.

**A:** Microscopic observation of A $\beta$ 42 precipitates by centrifugation in the presence of polyphenols. The aggregates were observed by 12.5-fold magnification. **B:** SDS-PAGE analysis of soluble A $\beta$ 42 peptide of supernatants in reaction mixtures. Arbitrary density of monomeric A $\beta$ 42 bands was calculated in the right column, 5  $\mu\text{L}/\text{lane}$ . **C:** A $\beta$  concentrations of supernatant and precipitate in the reaction mixtures. AP (100  $\mu\text{g/mL}$ ), PCs (65  $\mu\text{g/mL}$ ), and MNs (35  $\mu\text{g/mL}$ ) were incubated with A $\beta$ 42 (20  $\mu\text{mol/L}$ ) for 24 h and centrifuged to fractionate supernatants and pellets (ND: not detected; differences compared to vehicle groups, \*\*\* $P < 0.001$ , and \* $P < 0.05$ ). Values are the mean value  $\pm$  SEM,  $n = 3$ .



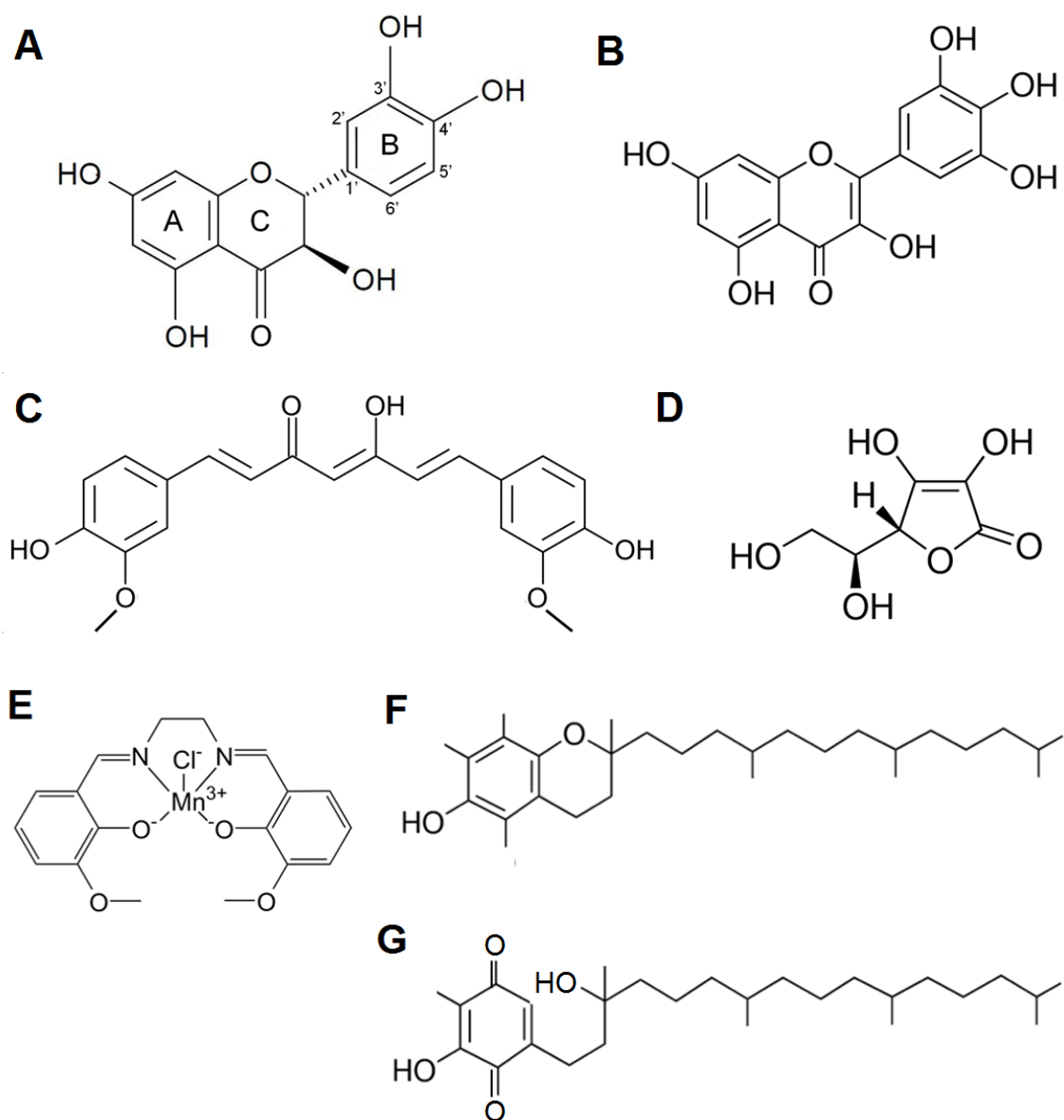
**Fig. 3.3** Apple polyphenols and procyanidins dissolve Aβ aggregation *in vitro*.

**A:** Dose-dependent dissociation of Aβ42 aggregates by polyphenols determined using Th-T analysis. Samples were preincubated with Aβ42 for 48 h (final concentration 20 μmol/L) and then incubated with various concentrations of AP, PCs, or MNs for an additional 0.5 h. **B:** Time-dependent Aβ42 deaggregation in the presence of polyphenols determined by the Th-T assay. Samples were preincubated with Aβ42 (20 μmol/L) for 48 h and then incubated with AP (360 μg/mL), PCs (240 μg/mL), or MNs (360 μg/mL). Differences compared to vehicle groups, \* $P < 0.001$ . Values are the mean value  $\pm$  SEM,  $n = 3$ .



**Fig. 3.4** Apple polyphenols and procyanidins restore viability of PC-12 cells treated with  $\text{A}\beta_{42}$ .

Cells were pretreated with various concentrations of AP, PCs and MNs for 1 h, and then, incubated with (A) or without (B) 1  $\mu\text{mol/L}$   $\text{A}\beta_{42}$  for 36 h. Cell viability was measured by the MTT assay. Values are the mean value  $\pm$  SEM,  $n = 3$ . Differences compared to the control group (0  $\mu\text{g/mL}$ ), \*\*\* $P < 0.001$  and \* $P < 0.05$ .



**Fig. 3.5** Structures of several polyphenols and antioxidants which show neuroprotective effects.

**A:** Taxifolin, a flavanonol from silymarin (*Silybum marianum*) seeds, that is the major active constituent of silymarin. **B:** Myricetin, that is a naturally occurring flavonol found in some fruits as well as other plants. **C:** Curcumin, **D:** vitamin C (L-ascorbic acid), **E:** EUK134, **F:** vitamin E ( $\alpha$ -tocopherol), and **G:**  $\alpha$ -tocopherol quinone, that is derivative of vitamin E.



## 第 4 章

### リンゴポリフェノールの線虫における生存率への影響

#### 4.1 緒言

本論文の第 3 章では、リンゴポリフェノール(AP)がアミロイド  $\beta$  タンパク質(A $\beta$ )に対して凝集を抑制し、A $\beta$  による細胞毒性を抑制することが明らかとなり、AP が抗老化作用を有する可能性を示した。一方で、本作用は *in vitro* での作用であり、実際に生体が摂取した際の老化抑制機能については明らかではない。そこで、本章では、老化評価に有効なモデル生物である線虫 (*Caenorhabditis elegans*)を用いて、*in vivo* での AP による抗老化作用を検証することとした。

線虫は、土壌に住む線形動物であり、全遺伝子約 19,000 個、体長は成虫で約 1 mm であり、体細胞は約 1,000 個から成る。受精卵の孵化後、約 3 日で成虫になり、その後雌雄同体では 3~4 日で産卵を終え、寿命は 3 週間程度である<sup>(1)</sup>。遺伝子の約 4 割はヒトに保存され、生命現象の基本的な分子機構には高い共通性がある<sup>(1)</sup>。生存時間と生存率をプロットした寿命曲線もヒトと似ており、寿命を制御する機構にも共通点があることが指摘されている<sup>(1)</sup>。線虫が加齢すると外見的にみられる老化現象として、運動性の低下、表皮の肥厚、体内の空胞産生、加齢性色素蓄積、筋萎縮、腸管への脂肪蓄積などが観察される<sup>(2,3)</sup>。線虫におけるカロリー制限試験では、ほ乳類と同様に生存率が上昇する<sup>(4)</sup>。食品成分では、ビタミン E の投与が線虫の生存率を向上させる<sup>(5)</sup>。また、ポリフェノールの一種である *trans*-レスベラトロールによる生存率向上作用には、ヒストン脱アセチル化酵素 Sir2 の活性化が関与していることが報告されている<sup>(6)</sup>。

本章では、AP、PC、および単量体カテキンの線虫の寿命(生存率)に対する影響を評価した。同様に、酸化ストレスが増大する *mev-1* 変異体線虫に対する生存率への影響について検証した。また、*sir-2* 変異体を用いて、PC の生存率上昇に関与する機構を検証した。さらに、神経変性凝集体形成線虫に対するPCの凝集体形成への影響について検証した。これらの試験を通じて、線虫を用いた AP および PC の生体に対する抗老化作用について検証した。

#### 4.2 材料および方法

##### 4.2.1 試薬

AP、PC およびモノマー画分の調製方法、および分析方法は第 2 章で述べた。*trans*-(-)-レスベ

ラトロール(RV, 純度 99%以上)は、Sigma 製を使用した。(-)-エピカテキン(EC) (純度 98%以上、緑茶由来)は、和光純薬工業製を使用した。

#### 4.2.2 使用生物

供試する線虫として、*Caenorhabditis elegans* 標準型 N2、*fem-1(hc17)*、*mev-1(kn1)*、および *sir-2.1(ok434)*を使用した。全ての線虫は、*C. elegans* 標準飼育法に従った<sup>(7)</sup>。各線虫は、Caenorhabditis Genetics Center (CGC)より入手した。黄色蛍光タンパク(YFP)を融合した 40 残基のポリグルタミン凝集体(polyQ)を形成する線虫 Q40 体は、米国ノースウェスタン大学の森本博士から供与された<sup>(8)</sup>。個体齢の同一化方法は、既報に従った<sup>(9)</sup>。すなわち、卵を保持した成虫からアルカリ過塩素酸を用いて孵化後の線虫を溶解し、残った卵を回収して、100 mM NaCl および 50 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 緩衝液(pH 6.0)から成る S-基本液体培地中で 20°Cで孵化させた。孵化後の L1 時期の幼虫を、200 µg/mL の硫酸ストレプトマイシン(Meiji Seika ファルマ)を含有し、大腸菌 OP50 株を塗布した線虫生育培地(nematode growth medium, NGM)寒天プレート上へ移し、20°Cで飼育した。

#### 4.2.3 生存率測定

孵化 3 日後の若い 5-10 匹の成虫を、各種ポリフェノールを含み、かつ産卵を抑制するため 10 µM の 5-fluoro-2'-deoxyuridine (FUDR)を含有した NGM 寒天プレート上へ移し替えた。それらの線虫は、マイクロピペットおよび滅菌水を用いて、2 日ごとに新しい培地へ移し替えた。機械的な刺激に応答しなくなったときを死亡時期とした。本生存率測定試験では、RV 投与群を陽性対照とした<sup>(10)</sup>。

#### 4.2.4 体長測定

N2 および *fem-1* 線虫は、Olympus 実体顕微鏡 SZX-12、Leica DFC300 カメラ、および Leica IM50 v4.0 ソフトウェアを使用して撮影した。体長は、撮影した画像上で、Leica Qwin Plus v3.5 ソフトウェアを用いて定量した。

#### 4.2.5 脱アセチル化活性測定

各ポリフェノールによる脱アセチル化活性測定は、SIRT1 Fluorescent Activity Kit (BIOMOL)を用いて実施した。アセチル化ペプチド基質として、p53(379-AcK382)-'Fluor de Lys' (FDL)を用いた場合は、25 µM の基質、25 µM の NAD、および 0.02 U/µL の SIRT1 を用いて 10 分間反応させた。アセチル化ペプチド基質として、histone H4(12-AcK16)-FDL を用いたときは、125 µM の基質、50 µM の NAD、および 0.02 U/µL の SIRT1 を用いて 60 分間反応させた。PC が反応系に

存在するときに、脱アセチル化 FDL 自体の蛍光強度に対して影響がないことをあらかじめ確認した。

#### 4.2.6 Q40 凝集体測定

線虫 Q40 体は、YFP を融合した polyQ 凝集体を体表筋細胞において形成する<sup>(8)</sup>。孵化 3 日後の若い 5-10 匹の成虫を、PC を含み、かつ産卵を抑制するため 10  $\mu$ M の FUDR を含有した NGM 寒天プレート上へ移し替えた。これらの線虫は、マイクロピペットおよび滅菌水を用いて、2 日ごとに新しい培地へ移し替えた。孵化から 12 日後に、Olympus 蛍光実体顕微鏡 SZX-12、Leica DFC300 カメラ、および Leica IM50 v4.0 ソフトウェアを使用して撮影し、凝集体を計数した。

#### 4.2.7 統計解析

統計解析は、SPSS v11.5 ソフトウェアを使用した。生存率解析における標準誤差および  $P$  値は Log-rank 検定法を使用した。 $P < 0.05$  を有意とした。試験群間の平均値比較は、Student's unpaired  $t$ -test、または分散分析 (ANOVA) によって行った。試験群間の多重比較は、その後の検定として Dunnett 法で行った<sup>(11)</sup>。

### 4.3 結果

#### 4.3.1 リンゴポリフェノールの投与による野生型線虫における生存率への影響

AP の抗老化作用を調べるため、野生型線虫における生存率を測定した。ブドウ (*Vitis* spp.) に含まれるポリフェノール RV の投与は、線虫、ショウジョウバエ、ゼブラフィッシュなどの生物で、生存率を上昇させることが報告されている<sup>(6,10,12-13)</sup>。本章では、RV を線虫の生存率試験における陽性対照とした。まず、野生型 N2 線虫に対する効果を検証した。培地への 65  $\mu$ g/mL の RV 添加により、野生型 N2 線虫の生存率は対照群と比べて有意に上昇し、平均生存率上昇の割合は既報と同程度であった (Fig. 4.1A, Table 4.1)<sup>(10)</sup>。培地への 100  $\mu$ g/mL の AP 添加により、N2 および不妊体である *fem-1* 線虫の生存率は有意に上昇し、平均生存率はそれぞれ 12.0% および 5.3% 上昇した (Table 4.1)。培地への 65  $\mu$ g/mL の PC 添加により、N2 および *fem-1* 線虫の生存率は対照群と比べて有意に上昇し、対照群の平均生存率より 12.1% および 5.3% 上昇した (Fig. 4.1A, C, D, Table 4.1)。また、PC の効果は用量依存的であった (Table 4.1)。PC による N2 および *fem-1* 線虫に対する有意な生存率の向上は、それぞれ 4 回および 3 回の試験で再現性が得られた (Table 4.1)。65  $\mu$ g/mL の PC による生存率向上は、100  $\mu$ g/mL の AP による向上と同程度であった。対照的に、AP から精製した単量体画分の培地への 35  $\mu$ g/mL の添加、または AP の単量体画分の最も多く

を占める EC の 65  $\mu\text{g/mL}$  の添加により、線虫の生存率は上昇しなかった(Fig. 4.1C, D, Table 4.1)。以上より、AP および PC が線虫の生存率を上昇させることが明らかとなった。65  $\mu\text{g/mL}$  の PC、および 65  $\mu\text{g/mL}$  の RV の添加は、体長、咽頭のポンプ回数、あるいは産卵数に影響はなかった(Fig. 4.1E-G)。以上より、PC と RV は線虫の生育性、食餌摂取、および産卵量へは影響しないことを示した。

#### 4.3.2 リンゴポリフェノールの投与による *mev-1* 線虫における生存率への影響

これまでにビタミン E、白金ナノ粒子、および緑茶(*Camellia sinensis*)由来エピガロカテキンガレート(EGCG)等の抗酸化物質は、線虫の生存率を向上することが報告されている<sup>(5,14,15)</sup>。とくに、EGCG の 220  $\mu\text{M}$  (100  $\mu\text{g/mL}$ ) 処理は、N2 線虫の平均生存率を 10.1%上昇し<sup>(15)</sup>、本研究での PC による上昇レベルはこれと同程度であった。そこで、PC の線虫における酸化ストレスに対する作用を調べるため、過剰な酸化ストレスによる短命な変異体である *mev-1* (*kn1*) 線虫<sup>(16)</sup>に対して PC 処理したときの生存率を測定した。PC は *in vitro* においては強い抗酸化作用を示すが<sup>(17)</sup>、*mev-1* 線虫への PC の 65  $\mu\text{g/mL}$  処理は、20°C および 25°C で生存率に影響を与えなかった(Fig. 4.2A, B, Table 4.1)。対照的に、RV は *mev-1* 線虫に対して生存率向上作用が認められた(Fig. 4.2B, Table 4.1)。PC は *mev-1* 線虫の生存率に影響を与える抗酸化作用を示さなかった。

#### 4.3.3 リンゴポリフェノールの投与による *sir-2.1* 変異体線虫における生存率への影響

これまでに RV は、Sir2 依存的に種々の生物の生存率を向上させることが報告されている<sup>(6,10,12-13)</sup>。PC の生存率向上作用における Sir2 の関与を調べるために、Sir2 活性が欠損した *sir-2.1* (*ok434*) 変異体線虫に対して、PC を処理したときの生存率を調べた。100  $\mu\text{g/mL}$  AP、65  $\mu\text{g/mL}$  PC および 65  $\mu\text{g/mL}$  RV の各処理により、*sir-2.1* 変異体線虫の生存率はいずれも上昇しなかった(Fig. 4.2C, Table 4.1)。したがって、これらの化合物は Sir2 依存的に線虫の生存率を向上させることが確認された。RV は、Sir2 および SIRT1 タンパクに直接的に作用して活性化することが報告されている<sup>(6,10)</sup>。そこで、SIRT に対して PC が直接的な活性化作用を示すかどうかについて確認するため、ヒト SIRT1 を用いて合成基質 p53 およびヒストン H4 に対する脱アセチル化活性評価を蛍光検出により行った。20  $\mu\text{g/mL}$  の RV 処理は SIRT1 活性を有意に増強したが、20  $\mu\text{g/mL}$  PC および 20  $\mu\text{g/mL}$  EC 処理は SIRT1 活性に影響を与えなかった(Fig. 4.2D, E)。以上より、PC は RV とは異なる作用によって線虫の生存率を向上させることを明らかにした。

#### 4.3.4 リンゴポリフェノールの投与による poly-Q 凝集線虫における凝集体形成への影響

PC の生体内におけるポリグルタミン(polyQ)凝集体形成に対する効果を調べるために、遺伝子組換え線虫である Q40 線虫<sup>(8)</sup>を用いて、PC 処理による polyQ 凝集体を定量した。12 日齢におい

て、polyQ-YFP 融合凝集体が線虫体表筋細胞に観察された(Fig. 4.3A, B)。65  $\mu\text{g/mL}$  PC 処理により、対照群と比べて polyQ-YFP 融合凝集体数は有意に減少した( $P < 0.05$ , Fig. 4.3B, C)。以上より、*in vivo* において PC が線虫における内在性の polyQ 凝集形成に対して抑制作用を有することを明らかにした。

#### 4.4 考察

本章では、線虫を用いて AP および PC の生存率に対する影響を評価した。AP および PC は、野生型線虫の生存率を向上することを明らかにした。個体寿命の延長は、老化の進行が抑制され、疾患の発症が抑制されたことを意味しており、AP は線虫に対して抗老化作用を有すると結論した。

AP の組成は、重量の半分以上を PC が占め、他は EC をはじめとするカテキン類、カルコンやフェノールカルボン酸類の単量体ポリフェノールから成る(Table 2.1)。本章では、AP と PC の両者が、同程度に生存率向上作用があることを示した。対照的に、AP 単量体画分および EC 単体は生存率を向上しなかった。単量体画分のもうひとつの主要なクロロゲン酸については、ブルーベリー由来のクロロゲン酸の線虫への投与は、生存率に影響を与えないことが報告されている<sup>(18)</sup>。以上より、AP の線虫生存率向上作用に影響を及ぼす主たる成分は PC と推察された。

本章では、PC が他の抗酸化剤と同様に、線虫に対する生存率向上作用を有することを明らかにした。PC は生体外で強力な抗酸化作用を有するが<sup>(19,20)</sup>、酸化ストレスに弱く短命な *mev-1* 変異体に対しては生存率への影響は確認されず、線虫に対する生体内での抗酸化作用は認められなかった。ROS と線虫の生存率との関係について、Schulz らは、ミトホルミシス(mitohormesis)効果について報告している<sup>(21)</sup>。これは、カロリー制限効果をもたらすグルコース制限が、線虫の生存率を向上するとともに、ミトコンドリア代謝を促進し、同時に ROS 産生量も増加させ、ROS の産生が生存率向上効果を示す例としている。しかし、当該生育条件下で抗酸化剤やビタミンを投与することによって、グルコース制限による生存率向上効果が相殺された<sup>(21)</sup>。抗酸化剤の投与は線虫において必ずしも生存率の向上作用を示さないことから、線虫における ROS と生存率の関係の解明についてはさらなる検証が必要である。

線虫の脱アセチル化酵素 Sir2 は、サーチュインファミリーの一種であり、酵母からヒトまで保存されており、寿命に影響を及ぼす長寿遺伝子として知られている<sup>(10,12)</sup>。一方、食品成分である RV による生存率向上作用は、Sir2 依存的であることが報告されている<sup>(6,10,12-13)</sup>。そこで、PC による延命効果の機序を探るため、Sir2 活性が欠損した *sir-2* 変異体線虫に対して、PC を処理したときの生存率を調べたところ、Fig. 4.2C に示すように、RV と同様に *sir-2* 変異体線虫の生存率は上昇せ

ず、Sir2 の機能欠損により生存率向上効果が相殺されることが明らかとなった。一方、RV は、SIRT1 に直接的に作用して脱アセチル化反応を活性化するが<sup>(6,10)</sup>、PC による直接的な SIRT1 活性化作用は確認されなかった。したがって、PC は RV とは異なる Sir2 依存的な作用によって線虫の生存率を向上することが考えられた。PC による Sir2 を介した生存率向上作用の機序として、2 つの可能性が考えられた。1 つ目は、*sir-2* 遺伝子の発現上昇である。*sir-2* 遺伝子の発現増加は、線虫の生存率を向上することが報告されているため<sup>(22)</sup>、*sir-2* 遺伝子の発現制御が関連する可能性がある(Fig. 4.4)。2 つ目は、Sir2 活性に重要な補酵素である NAD の代謝制御である(Fig. 4.4)。この仮説を検証するためには、さらなる試験が必要である。一方、Wilson らは、ブルーベリー由来の PC 画分が Sir2 非依的に線虫の生存率を向上すると報告しており<sup>(18)</sup>、本章の結果とは異なる。この理由としては、ブルーベリー由来 PC は重合度が 10 を超える高分子が主成分であり、かつ、リンゴには含まれない A タイプの PC を多く含む<sup>(23,24)</sup>。ブルーベリーとリンゴでは、PC の分子量および分子構造の構成に大きな相違があると考えられるため、作用性にも相違があることが想定された。

カロリー制限は、線虫の生存率を向上する。*eat-2* 変異体線虫は、摂食に關与する咽頭ポンプ機能障害によって、食餌摂取量が制限されるため、体長が短く、長寿を表現型とする変異体である<sup>(25)</sup>。本研究では、PC 摂取の有無に関わらず、線虫の咽頭ポンピング回数、および体長に違いはみられなかったことから、PC は食餌摂取量を制限していないこと、および PC の生存率向上作用にはカロリー制限作用は關与していないことが示唆された。

第 3 章では、*in vitro* で Aβ に対する PC の凝集抑制作用を明らかにしたが、興味深いことに、本章では生体内で polyQ の凝集抑制作用を確認した(Fig. 4.3B, C)。Ehrnhoefer らは、緑茶由来 EGCG が *in vitro* で polyQ を含むタンパク質のミスホールディングを調節することを報告している<sup>(26)</sup>。本研究では、Q40 線虫を用いてリンゴ PC が生体内で polyQ 凝集を抑制することを初めて示した。PC は、*in vivo* で polyQ が介する毒性に対して緩和する食品因子となる可能性を示した。

本研究では、PC と RV が、野生型線虫に対して生存率の上昇度が同程度を示すことを明らかにした。RV は、高脂肪食マウスでの生存率向上作用が報告され<sup>(27)</sup>、近年注目される食品成分である。RV は、ブドウの種や皮に含まれるポリフェノール成分であるため、ワインの中でも、果皮および種子ごと発酵させてから圧搾する赤ワインにのみ微量に存在する。対照的に、PC はリンゴ果汁や赤ワイン中に、RV より高濃度で存在する<sup>(28,29)</sup>。赤ワインから必要量の RV を摂取するためには多量飲酒が必要であり、アルコール過剰摂取となってしまう。PC はワインのみならず各種の食品中に摂取しやすい形で高濃度で存在するため、RV よりも安価に供給することが可能で、とくに調製が容易なリンゴポリフェノールは健康食品市場において高付加価値の食品成分となることが期待される。

#### 4.5 要約

本章では、線虫 *C. elegans* を用いて AP およびその主成分である PC の生存率に対する影響を評価した。その結果、100 µg/mL の AP 添加により、野生型 N2 および *fem-1* 線虫の生存率は同様に有意に上昇し( $P < 0.0001$ )、平均生存率は対照群と比べてそれぞれ 12.0%および 5.3%上昇した。65 µg/mL の PC 添加により、N2 および *fem-1* 線虫の生存率は対照群と比べて有意に上昇し( $P < 0.0001$ )、平均生存率は対照群と比べてそれぞれ 12.1%および 8.4%上昇した。また、PC の効果は用量依存的であり、RV と同等の効果であった。対照的に、EC 添加は生存率に影響を与えなかった。AP 添加は体長、摂食量、および産卵数に影響を与えなかった。PC は、酸化ストレスが増大した短命な線虫である *mev-1* 変異体の生存率に影響を与えなかった。さらに、AP および PC は、RV と同様に、ヒストン脱アセチル化酵素であるサーチュインファミリーの一種 Sir2 活性が欠損した線虫である *sir-2* 変異体の生存率に影響を与えなかった。以上より、*C. elegans* に対する AP の生存率向上作用には、Sir2 が関与することが示唆された。

#### 4.6 参考文献

1. 本田修二. 寿命をのばす遺伝子 線虫の研究から. 老年学公開講座 **62**, p.p. 54-87 (2001)
2. Herndon, L.A., Schmeissner, P.J., Dudaronek, J.M. Stochastic and genetic factors influence tissue-specific decline in ageing *C. elegans*. *Nature*. **419**, 808-814 (2002)
3. Garigan, D., A.L., H., Fraser, A.G. Genetic analysis of tissue aging in *Caenorhabditis elegans*: a role for heat-shock factor and bacterial proliferation. *Genetics*. **161**, 1101-1112 (2002)
4. Lakowski, B., Hekimi, S. The genetics of caloric restriction in *Caenorhabditis elegans*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **95**, 13091-13096 (1998)
5. Harrington, L.A., Harley, C.B. Effect of vitamin E on lifespan and reproduction in *Caenorhabditis elegans*. *Mech Ageing Dev*. **43**, 71-78 (1988)
6. Valenzano, D.R., Terzibasi, E., Genade, T., Cattaneo, A., Domenici, L., Cellarino, A. Resveratrol prolongs lifespan and retards the onset of age-related markers in a short-lived vertebrate. *Curr Biol*. **16**, 296-300 (2006)
7. Brenner, S. The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*. **77**, 71-94 (1974)
8. Morley, J.F., Brignull, H.R., Weyers, J.J., Morimoto, R.I. The threshold for polyglutamine-expansion protein aggregation and cellular toxicity is dynamic and influenced by aging in *Caenorhabditis elegans*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **99**, 10417-10422 (2002)
9. Emmons, S.W., Klass, M.R., Hirsh, D. Analysis of the constancy of DNA sequences during development and evolution of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **76**, 1333-1337 (1979)
10. Wood, J.G., Rogina, B., Lavu, S., Howitz, K., Helfand, S.L., Tatar, M., Sinclair, D. Sirtuin activators mimic caloric restriction and delay ageing in metazoans. *Nature*. **430**, 686-689

- (2004)
11. Ludbrook, J. Multiple comparison procedures updated. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* **25**, 1032-1037 (1998)
  12. Howitz, K.T., Bitterman, K.J., Cohen, H.Y., Lamming, D.W., Lavu, S., Wood, J.G., Zipkin, R.E., Chung, P., Kisielewski, A., Zhang, L.L., Scherer, B., Sinclair, D.A. Small molecule activators of sirtuins extend *Saccharomyces cerevisiae* lifespan. *Nature.* **425**, 191-196 (2003)
  13. Bauer, J.H., Goupil, S., Garber, G.B., Helfand, S.L. An accelerated assay for the identification of lifespan-extending interventions in *Drosophila melanogaster*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **101**, 12980-12985 (2004)
  14. Kim, J., Takahashi, M., Shimizu, T., Shirasawa, T., Kajita, M., Kanayama, A., Miyamoto, Y. Effects of a potent antioxidant, platinum nanoparticle, on the lifespan of *Caenorhabditis elegans*. *Mech Ageing Dev.* **129**, 322-331 (2008)
  15. Abbas, S., Wink, M. Epigallocatechin gallate from green tea (*Camellia sinensis*) increases lifespan and stress resistance in *Caenorhabditis elegans*. *Planta Med.* **75**, 216-221 (2009)
  16. Senoo-Matsuda, N., Yasuda, K., Tsuda, M., Ohkubo, T., Yoshimura, S., Nakazawa, H., Hartman, P.S., Ishii, N. A defect in the cytochrome b large subunit in complex II causes both superoxide anion overproduction and abnormal energy metabolism in *Caenorhabditis elegans*. *J Biol Chem.* **276**, 41553-41558 (2001)
  17. Leontowicz, H., Gorinstein, S., Lojek, A., Leontowicz, M., Ciz, M., Soliva-Fortuny, R., Park, Y.S., Jung, S.T., Trakhtenberg, S., Martin-Belloso, O. Comparative content of some bioactive compounds in apples, peaches and pears and their influence on lipids and antioxidant capacity in rats. *J. Nutr. Biochem.* **13**, 603-610 (2002)
  18. Wilson, M.A., Shukitt-Hale, B., Kalt, W., Ingram, D.K., Joseph, J.A., Wolkow, C.A. Blueberry polyphenols increase lifespan and thermotolerance in *Caenorhabditis elegans*. *Aging Cell.* **5**, 59-68 (2006)
  19. Plumb, G.W., De Pascual-Teresa, S., Santos-Buelga, C., Cheynier, V., Williamson, G. Antioxidant properties of catechins and proanthocyanidins: effect of polymerisation, galloylation and glycosylation. *Free Radic Res.* **29**, 351-358 (1998)
  20. Sunagawa, T., Masuda, I., Shimizu, T. *Anti-aging effects of apple procyanidins. Proanthocyanidins: Food Sources, Antioxidant Properties and Health Benefits.* Nova Science Publishers, Hauppauge, NY, p.p. 139-159 (2015)
  21. Schulz, T.J., Zarse, K., Voigt, A., Urban, N., Birringer, M., Ristow, M. Glucose restriction extends *Caenorhabditis elegans* life span by inducing mitochondrial respiration and increasing oxidative stress. *Cell Metab.* **6**, 280-293 (2007)
  22. Tissenbaum, H.A., Guarente, L. Increased dosage of a *sir-2* gene extends lifespan in *Caenorhabditis elegans*. *Nature.* **410**, 227-230 (2001)
  23. Gu, L., Kelm, M., Hammerstone, J.F., Beecher, G., Cunningham, D., Vannozzi, S., Prior, R.L. Fractionation of polymeric procyanidins from lowbush blueberry and quantification of procyanidins in selected foods with an optimized normal-phase HPLC-MS fluorescent detection method. *J Agric Food Chem.* **50**, 4852-4860 (2002)
  24. Toomik, P., Püssa, T., Raal, A. Variability of procyanidin type A- and -B trimers content in aerial parts of some *Vaccinium* species and cultivars. *Nat Prod Commun.* **9**, 815-816 (2014)
  25. Mörck, C., Pilon, M. *C. elegans* feeding defective mutants have shorter body lengths and increased autophagy. *BMC Dev Biol.* **6**, 39 (2006)
  26. Ehrnhoefer, D.E., Duennwald, M., Markovic, P., Wacker, J.L., Engemann, S., Roark, M., Legleiter, J., Marsh, J.L., Thompson, L.M., Lindquist, S., Muchowski, P.J., Wanker, E.E. Green



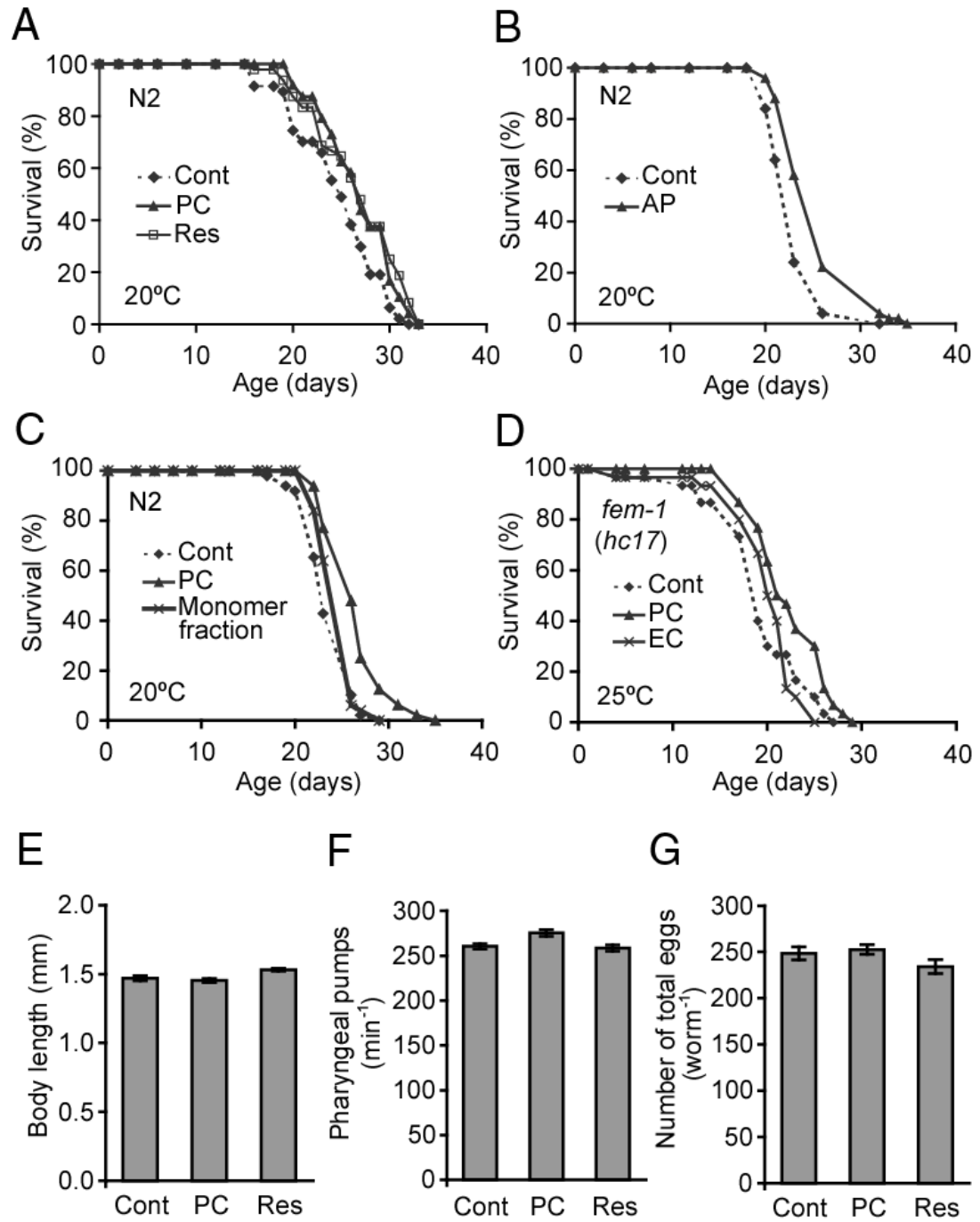
- tea (-)-epigallocatechin-gallate modulates early events in huntingtin misfolding and reduces toxicity in Huntington's disease models. *Hum Mol Genet.* **15**, 2743-2751 (2006)
27. Baur, J.A., Pearson, K.J., Price, N.L., Jamieson, H.A., Lerin, C., Kalra, A., Prabhu, V.V., Allard, J.S., Lopez-Lluch, G., Lewis, K., Pistell, P.J., Poosala, S., Becker, K.G., Boss, O., Gwinn, D., Wang, M., Ramaswamy, S., Fishbein, K.W., Spencer, R.G., Lakatta, E.G., Le Couteur, D., Shaw, R.J., Navas, P., Puigserver, P., Ingram, D.K., de Cabo, R., Sinclair, D.A. Resveratrol improves health and survival of mice on a high-calorie diet. *Nature.* **444**, 337-342 (2006)
  28. Corder, R., Mullen, W., Khan, N.Q., Marks, S.C., Wood, E.G., Carrier, M.J., Crozier, A. Oenology: red wine procyanidins and vascular health. *Nature.* **444**, 566 (2006)
  29. Oszmianski, J., Wojdylo, A., Kolniak, J. Effect of enzymatic mash treatment and storage on phenolic composition, antioxidant activity, and turbidity of cloudy apple juice. *J Agric Food Chem.* **57**, 7078-7085 (2009)

**Table 4.1** Effects of procyanidins from apple polyphenol on the lifespan of *C. elegans*

Strain	Trial	Temperature	Treatment	<i>n</i>	Mean of lifespan		Log-rank test		% change
					Days	SE	<i>P</i>		
N2	1	25°C	Control	51	19.4	0.46	-		-
			0.65 µg/mL procyanidins	50	19.4	0.35	0.6566		0.2
			6.5 µg/mL procyanidins	50	19.9	0.47	0.3686		2.6
			65 µg/mL procyanidins	50	22.6	0.52	< 0.0001	***	16.6
	2	20°C	Control	47	24.6	0.65	-		-
			65 µg/mL procyanidins	48	26.9	0.54	0.0140	*	9.2
			65 µg/mL resveratrol	48	26.7	0.66	0.0063	**	8.5
	3	20°C	Control	50	23.1	0.39	-		-
			100 µg/mL apple polyphenol	50	25.8	0.55	0.0001	***	12.0
	4	20°C	Control	49	23.8	0.35	-		-
			65 µg/mL procyanidins	48	26.4	0.36	< 0.0001	***	10.7
	5	20°C	Control	49	23.8	0.36	-		-
			65 µg/mL procyanidins	48	26.7	0.43	< 0.0001	***	11.9
			35 µg/mL monomer fraction	48	24.9	0.27	0.0678		4.5
<i>fem-1</i> ( <i>hc17</i> )	1	25°C	Control	59	20.4	0.32	-		-
			100 µg/mL apple polyphenol	55	21.5	0.37	0.0017	**	5.3
			65 µg/mL procyanidins	60	21.5	0.32	0.0150	*	5.3
			65 µg/mL resveratrol	60	20.7	0.49	0.0239	*	1.8
	2	25°C	Control	30	19.3	0.87	-		-
			65 µg/mL procyanidins	30	22.4	0.66	0.0098	**	16.1
			65 µg/mL (-)-epicatechin	30	19.9	0.73	0.9968		3.4
			65 µg/mL resveratrol	29	18.0	0.76	0.0739		-6.7
	3	25°C	Control	45	18.0	0.29	-		-
			65 µg/mL procyanidins	45	18.6	0.41	0.0559		3.7
<i>sir-2.1</i> ( <i>ok434</i> )	1	20°C	Control	61	20.0	0.76	-		-
			100 µg/mL apple polyphenol	59	18.9	0.60	0.0248	*	-6.0
			65 µg/mL procyanidins	53	18.6	0.64	0.0171	*	-7.0
			65 µg/mL resveratrol	58	19.9	0.63	0.2610		0.0
	2	20°C	Control	41	20.9	1.00	-		-
			65 µg/mL procyanidins	39	20.9	1.14	0.9004		0.0
			65 µg/mL (-)-epicatechin	32	20.1	1.23	0.5247		-4.0
			65 µg/mL resveratrol	40	19.2	1.12	0.0222	*	-8.0
<i>mev-1</i> ( <i>kn1</i> )	1	20°C	Control	50	19.4	0.70	-		-
			65 µg/mL procyanidins	50	19.8	0.57	0.8377		1.9
	2	25°C	Control	74	13.1	0.24	-		-
			65 µg/mL procyanidins	70	13.5	0.26	0.2124		3.6
			65 µg/mL resveratrol	69	14.0	0.37	0.0088	**	6.8

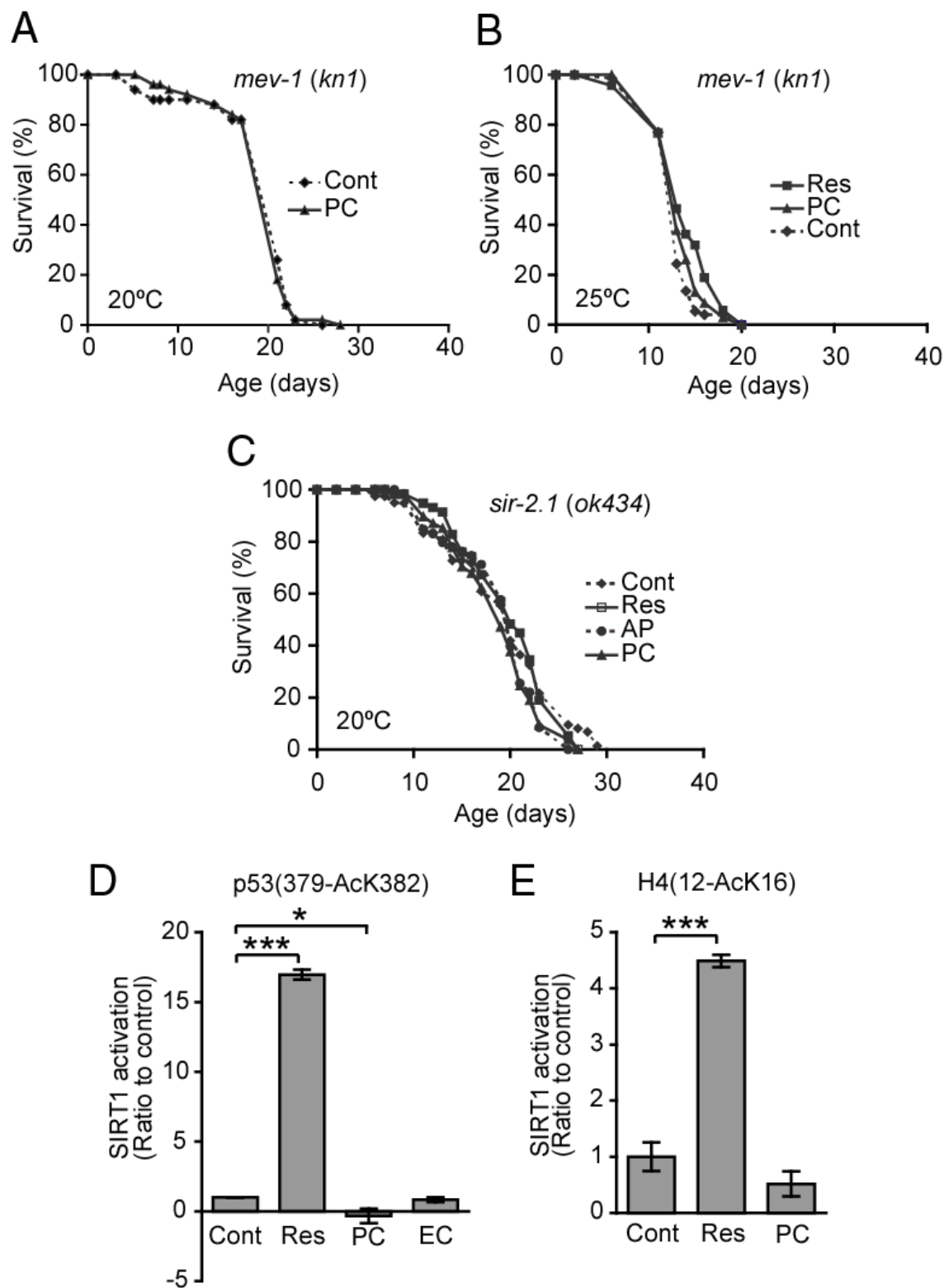
Log-rank test *P*-value compared with the Control (untreated worms). \*\*\**P* < 0.0001, \*\**P* < 0.01,

\**P* < 0.05.



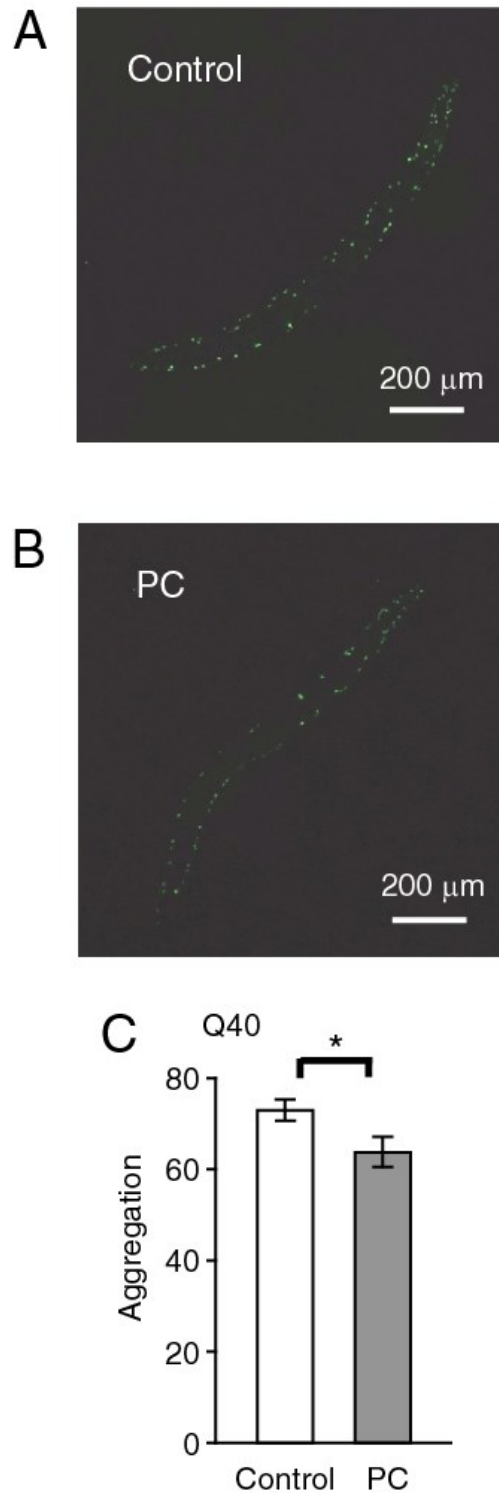
**Fig. 4.1** Apple polyphenols and procyanidins purified from apple polyphenols extend the lifespan of *Caenorhabditis elegans*.

**A,B**, Survival curves of wild-type N2 worms treated with 65  $\mu\text{g/mL}$  procyanidins (PC), 65  $\mu\text{g/mL}$  resveratrol (Res), or 100  $\mu\text{g/mL}$  apple polyphenols (AP). Control experiments (Cont) were performed without treatment of polyphenols. Treatment with PC, resveratrol, or AP significantly extended the lifespan of the worms compared with the control treatment. The survival statistics are summarized in Table 4.1. **C**, Survival curves of wild-type N2 worms treated with 65  $\mu\text{g/mL}$  PC or 35  $\mu\text{g/mL}$  of the monomer fraction from AP. Survival statistics are shown in Table 4.1. **D**, Survival curves of *fem-1* worms treated with 65  $\mu\text{g/mL}$  PC or 65  $\mu\text{g/mL}$  (-)-epicatechin (EC). PC significantly extended the lifespan of the worms compared to the control treatment. Survival statistics are displayed in Table 4.1. **E**, Body length of N2 worms (day 11 after hatching). Treatment with 65  $\mu\text{g/mL}$  PC or 65  $\mu\text{g/mL}$  resveratrol had no effect on the body lengths of the worms. Values are shown as the mean value  $\pm$  SEM,  $n = 25$ . **F**, Pharyngeal pumping rate of N2 worms (day 5 after hatching). Treatment with 65  $\mu\text{g/mL}$  PC or 65  $\mu\text{g/mL}$  resveratrol had no effect on the pharyngeal pumping rate of the worms. Values are shown as the mean value  $\pm$  SEM,  $n = 6\sim 7$ . **G**, Total number of eggs laid by the N2 worms. Treatment with 65  $\mu\text{g/mL}$  PC or 65  $\mu\text{g/mL}$  resveratrol had no effect on the number of eggs laid per animal. Values are shown as the mean value  $\pm$  SEM,  $n = 6$ .



**Fig. 4.2** *sir-2* mediates procyanidin-induced longevity.

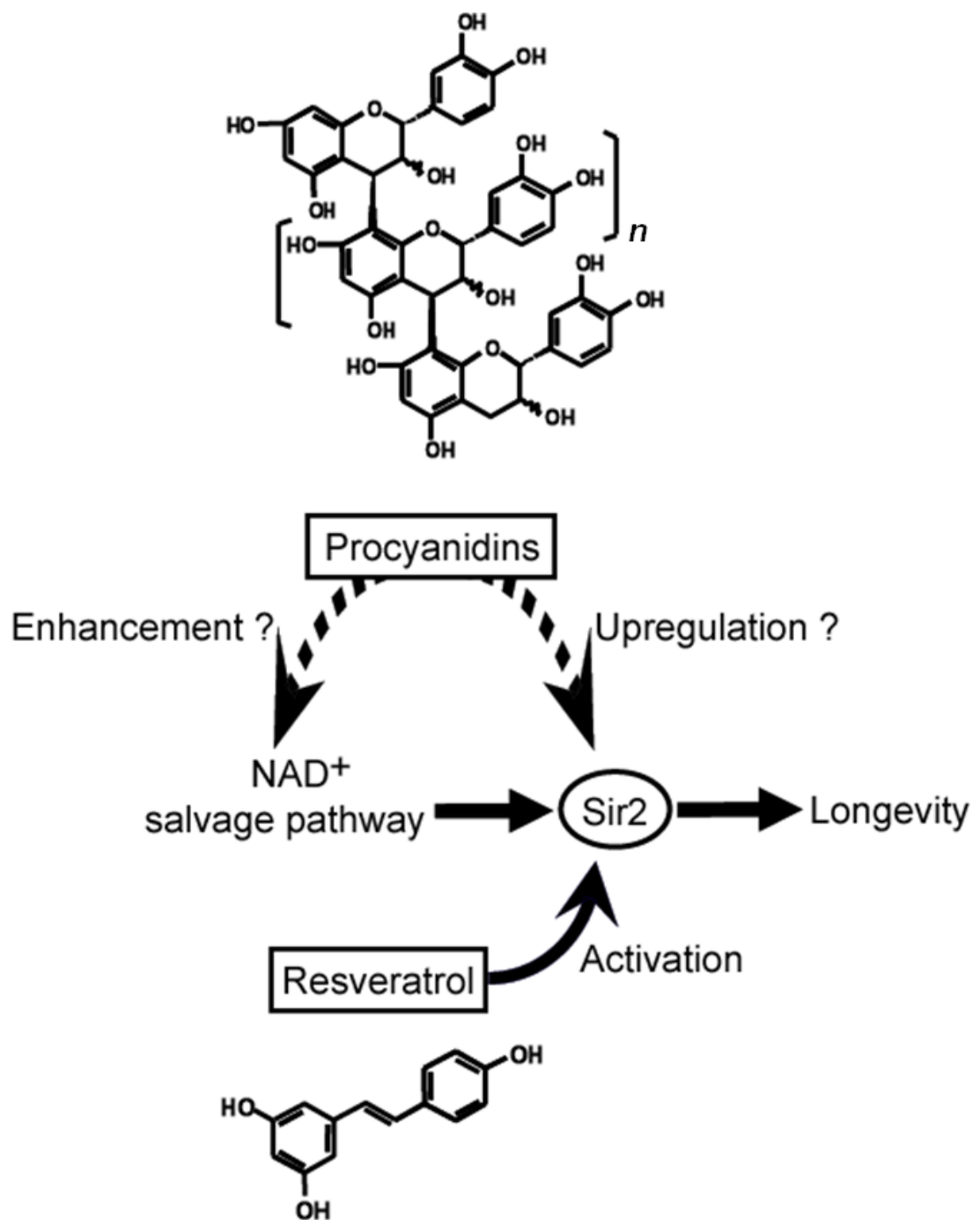
**A,B**, Survival curves of *mev-1* worms treated with 65 µg/mL PC or 65 µg/mL resveratrol. PC had no impact on *mev-1* lifespan. Survival statistics are summarized in Table 4.1. **C**, Survival curves of *sir-2.1* worms treated with 100 µg/mL AP, 65 µg/mL PC, or 65 µg/mL resveratrol. Treatment with AP, PC, or resveratrol had no effect on longevity. Survival statistics are summarized in Table 4.1. **D,E**, Fluorescent deacetylation assays with human SIRT1 using the synthetic fluorogenic substrates p53 and histone H4. Incubation with PC did not enhance SIRT1 activity. Values are shown as the mean value ± SEM,  $n = 3$ . Different from the control group, \*\*\* $P < 0.001$ , \* $P < 0.05$ . Abbreviations are as follows: Cont, control; Res, *trans*-resveratrol; EC, (-)-epicatechin.



**Fig. 4.3** Procyanidins reduce aggregation of *C. elegans*.

**A,B,** *C. elegans* Q40 strains (A) and treated with PC (B). **C,** The number of aggregates of Q40 worms treated with PC (12-day-old). PC significantly reduced aggregates of worms.

Values are mean value  $\pm$  SEM, control,  $n = 18$ ; PC,  $n = 9$ . \* $P < 0.05$ .



**Fig. 4.4** Model of the longevity effects of procyanidins mediated by a *sir-2*-dependent pathway.



## 第 5 章

### リンゴポリフェノールの心筋特異的 Mn-SOD 欠損マウスにおける 酸化ストレスおよび生存率への影響

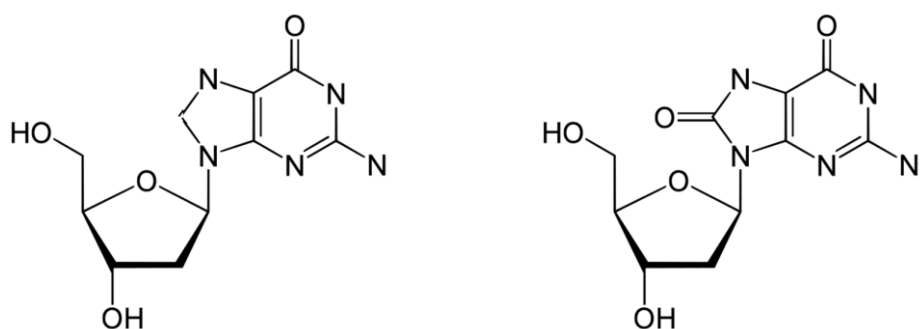
#### 5.1 緒言

本論文の第 2 章では、リンゴポリフェノール(AP)の摂取により、ラットの血中コレステロール値を低減し、肝臓でのコレステロール代謝遺伝子の発現変動が関わることを明らかにした。また、第 4 章では、線虫で AP の投与が生存率を向上し、その抗老化作用は高等生物まで保存されている長寿遺伝子とされる NAD<sup>+</sup>依存ヒストン脱アセチル化酵素 Sir2 が何らかの関わりがあることが示された。Sir2 は、ほ乳類でそのホモログが抗酸化酵素遺伝子の発現を上昇させることが知られており<sup>(1)</sup>、AP の摂取と抗酸化酵素活性の上昇との関連性が期待された。一方、第 1 章で記述した酸化ストレスと老化との関連性の観点では、第 4 章の線虫における AP の作用について抗酸化作用との関連性は不明であった。そこで、本章では、ヒトへの外挿が理解しやすいほ乳類における老化モデル生物を用いて、*in vivo* での AP による抗酸化作用の検証、および抗酸化作用と抗老化作用との関連性を検証することとした。

活性酸素種(ROS)の産生と抗酸化防御系のバランスの障害は、酸化ストレスを引き起こし、組織傷害、および機能障害に結びつくことが知られている<sup>(2)</sup>。また、酸化損害の蓄積が老化を加速することが報告されている<sup>(3)</sup>。DNA 中のデオキシグアノシンが酸化をうけて生成する 8-オキシ-2'-デオキシグアノシン(8-oxodG)は生体の DNA 酸化傷害マーカーとして知られている(Fig. 5.1)<sup>(4)</sup>。加齢したマウスの臓器における 8-oxodG の量を若齢マウスと比較すると、細胞分化が終了した寿命の長い細胞が多い臓器である、脳、心臓、骨格筋において、より増加することが示されている<sup>(5)</sup>。そのうち心臓においては、加齢に伴った ROS 産生の増加が、心機能異常に関係することが示唆されている<sup>(6-8)</sup>。一方、生体が有する抗酸化酵素のうち、スーパーオキシド ( $O_2^{\cdot-}$ ) を  $H_2O_2$  と酸素に不均化する酵素としてスーパーオキシドジスムターゼ (SOD) がある。SOD には 3 種のアイソザイム、copper/zinc-SOD (CuZn-SOD)、manganese-SOD (Mn-SOD)、および extracellular-SOD (EC-SOD) があり、それぞれ細胞質、ミトコンドリア、および細胞外と血漿に局在している<sup>(9)</sup>。ミトコンドリアでの酸化的リン酸化反応の副産物として生じる  $O_2^{\cdot-}$  は、ミトコンドリアのマトリクスに局在する Mn-SOD によって消去されるため、ミトコンドリアでの抗酸化には、Mn-SOD が重要な役割を担うと考えられる。これまで Mn-SOD と心臓関連疾患との関係については、ヒトにおける Mn-SOD 遺伝子多型と特発性拡張型心筋症 (DCM) との関連性が報告されている<sup>(10,11)</sup>。一方、全身性の

Mn-SOD 欠損マウスの報告では、重度の DCM、肝機能障害、代謝性アシドーシス<sup>(12)</sup>、および神経変性<sup>(13)</sup>を起こし、Mn-SOD と DCM との関連が示唆されている。本欠損マウスは胎生期または生後直後に死亡してしまうため、心臓における酸化傷害解析や DCM 病態解析は困難であった。そこで Nojiri らは、慢性的な ROS 傷害の影響を解析するために、Cre-loxP システムを用いて心筋特異的に発現する筋クレアチンキナーゼ (MCK) のプロモーター制御下で全身ではなく心筋特異的に Mn-SOD を欠損したマウス (heart/muscle-*Sod2*<sup>-/-</sup>, H/M-*Sod2*<sup>-/-</sup>) を作製した<sup>(14)</sup>。この欠損マウスの心臓組織および心機能を対照マウスと比較したところ、心臓重量は成長とともに上昇し、心エコーから左室内径に拡張が認められ、心機能の著しい低下が観察された。心筋から単離したミトコンドリアの呼吸鎖複合体活性は低下し、タンパク質レベルでの呼吸鎖複合体の減少も観察された。ATP の産生量が減少し、O<sub>2</sub><sup>•-</sup>の産生量は増加した。以上より、活性酸素傷害による心筋ミトコンドリア機能不全が心不全発症のメカニズムに強く関与していることが示唆された。通常の C57BL/6 系マウスは寿命が 2~3 年のところ、本欠損マウスは成長とともに DCM が進行することによって、寿命は最大で半年程度となった。本欠損マウスは、内因性の ROS が関与するヒトの心不全の治療効果を研究する上で極めて有用であるとともに、加齢ともなって上昇する ROS によって進行する生体傷害に対する食材の予防効果を検証する実験モデルとして有効と考えられる。抗酸化食品は健康維持および病気の予防のために栄養補助食品として広く使用され、市場は欧米で特に伸長し、健康維持や QOL 向上の役割が期待されている<sup>(15)</sup>。

本章では、内因性の過剰な酸化ストレスによって老化が促進的に進行するモデルマウスの生存率および酸化ストレスに対する、抗酸化食品として期待される AP の影響について検証した。



**Fig. 5.1** Structure of 2'-deoxyguanosine (dG, left) and 8-oxo-2'-deoxyguanosine (8-oxodG, right). 8-oxodG that is an oxidized derivative of dG is one of the oxidative lesions in nucleic acids.

## 5.2 材料および方法

### 5.2.1 試薬

AP、PC およびモノマー画分の調製および分析方法は、第 2 章 2.1.1 に準拠した。

### 5.2.2 使用動物

H/M-*Sod2*<sup>-/-</sup>マウスは体外受精により、心筋・骨格筋で特異的に発現する MCK プロモーターへ Cre リコンビナーゼを連結したマウスと、*Sod2*<sup>flx/flx</sup> マウスとの交配によって作製した。本研究では 4 試験群を設定した。すなわち、H/M-*Sod2*<sup>-/-</sup> (欠損マウス)、H/M-*Sod2*<sup>-/-</sup>+AP (欠損マウス AP 摂取群)、*Sod2*<sup>flx/flx</sup> (対照マウス、図中では Control と表記)、および *Sod2*<sup>flx/flx</sup>+AP (対照マウス AP 摂取群、図中では Control+AP と表記)。AP 摂取群では、生後直後から親に対して、また 3 週齢時の離乳後は飲料水として 0.1%(w/v)、または 0.5%(w/v)の AP を含む水を自由摂取させた。タモキシフェン誘導性 Mn-SOD 欠損マウス (*Rosa26-CreERT2*<sup>c/w</sup>, *Sod2*<sup>flx/flx</sup>) は、*ROSA26* プロモーター-CreERT2 マウスと *Sod2*<sup>flx/flx</sup> マウスとの交配によって作製した<sup>(16)</sup>。マウスはすべて、12h の光サイクル (08:00-20:00) の下で病原体フリーのバリア施設 (23.5±0.5°C) においてプラスチックケージ内で飼育した。飼育および動物試験はすべて東京都老人総合研究所、および千葉大学の動物実験審査委員会によって承認されたものである。

### 5.2.3 血液成分分析

クレアチンホスホキナーゼ (CPK) 測定のための採血は、下大静脈から行った。血清 CPK 値は、Cica Liquid CK (関東化学) を用いて測定した。

### 5.2.4 C2C12 細胞を使用した抗酸化作用の測定

マウス筋芽細胞 C2C12 細胞 (RCB0987、理研バイオリソースセンター)は、0.1 または 1.0 mg/mL の AP で 30 分間インキュベートし、PBS で 2 度洗浄後、200 μmol/mL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>を含む培地で 1 時間培養した。H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 無添加群を対照とした。その後、PBS で洗浄し、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> なしの培地を添加した。あらかじめ、AP 10mg/mL で細胞毒性を示さないことを確認した。細胞内の ROS レベルは、5-(and-6)-chloromethyl-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, acetyl ester (CM-H<sub>2</sub>DCFDA、Invitrogen) を使用して測定した。CM-H<sub>2</sub>DCFDA は、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>、ヒドロキシラジカル、およびヒドロペルオキシドのような細胞内の ROS の非特異的な検出試薬である。CM-H<sub>2</sub>DCFDA は DMSO で 1 mmol/L に溶解して使用した。細胞は 37°C で 20 分間、CM-H<sub>2</sub>DCFDA (10 μmol/L) を含む HANKS 緩衝液で培養した。その後、緩衝液で 3 回洗浄し、Leica DFC300 FX Camera および Leica IM50 v4.0ソフトウェアを使用して撮影した。細胞内蛍光強度は Leica Qwin v3.5ソフトウェアを使用して解析した。

#### 5.2.5 マウス胎児線維芽細胞 (MEF) の分離

MEF は、E14.5 のタモキシフェン誘導性 Mn-SOD 欠損マウス胎児を、0.25%(w/v)のトリプシン-EDTA (Invitrogen) で 37°C で 30 分間インキュベートすることによって分離した。MEF は 10%(w/v)ウシ胎児血清 (FBS)、100 unit/ml ペニシリン、および 0.1 mg/ml ストレプトマイシンを添加した、 $\alpha$ -MEM (Invitrogen) で培養した。*Sod2* 遺伝子を削除するため、4-OH-タモキシフェン (1  $\mu$ mol/L, Calbiochem) を 0 および 3 日目に添加した。3 および 6 日目において、ゲノムを鋳型とした PCR による flox アリル配列の非増幅と欠損アリルの増幅、およびウェスタンブロットによる Mn-SOD タンパク質の損失の確認を行った。細胞内の ROS レベルは 6 日目に測定した。

#### 5.2.6 心筋細胞の分離

マウス心臓からの心筋細胞の単離は、文献の方法に従った<sup>(17)</sup>。雌 5 ヶ月齢マウスを使用した。まず、ウレタン (1.5g/kg, i.p.) で麻酔をかけ開胸したマウスに、300 U/kg でヘパリンナトリウム (ノボヘパリン、持田製薬) を静脈内投与後、心臓を摘出した。心臓は氷冷した Tyrode 溶液 (143 mmol/L NaCl, 5.4 mmol/L KCl, 0.5 mmol/L  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 0.33 mmol/L  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 1.8 mmol/L  $\text{CaCl}_2$ , 5.5 mmol/L グルコース、および 5.0 mmol/L HEPES; NaOH で pH 7.4 に調整) で洗浄後、ランゲンドルフ灌流装置に固定され 37 $\pm$ 0.5°C で酸素通気処理された Tyrode 溶液で冠動脈経由で 15 分間の緩やかな速度で灌流を行った。その後、37 $\pm$ 0.5°C で酸素通気処理された  $\text{Ca}^{2+}$ を含まない Tyrode 溶液で 15 分間灌流した。さらに、37 $\pm$ 0.5°C で酸素通気処理された 0.26 mg/mL のコラゲナーゼ (和光純薬工業) を含み  $\text{Ca}^{2+}$ を含まない Tyrode 溶液で 10-15 分間灌流した。その後、50 mL の Kraft-Brühe (KB) 溶液 (70 mmol/L KOH, 50 mmol/L L-グルタミン酸, 40 mmol/L KCl, 20 mmol/L タウリン, 20 mmol/L  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 3.0 mmol/L  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 10 mmol/L グルコース, 1.0 mmol/L EGTA, 10 mmol/L HEPES; KOH で pH 7.4 に調製) で灌流した。さらに、左心室心尖部を切り出し、KB 溶液中でハサミにより裁断後、70  $\mu$ m セルストレーナー (BD バイオサイエンス) によってろ過した。分離された心筋細胞は、4°C の KB 溶液中で保存し、12 時間以内に測定に使用した。

#### 5.2.7 細胞内 ROS の測定

*Rosa26-CreERT2<sup>c/w</sup>*, *Sod2<sup>flox/flox</sup>* MEF における細胞内 ROS 産生の評価には、細胞内  $\text{O}_2^{\cdot -}$ の特異的な検出試薬である Dihydroethidium (DHE) を使用した<sup>(18)</sup>。DHE は  $\text{O}_2^{\cdot -}$ によりエチジウムに酸化し、核 DNA に組み入れられる<sup>(18)</sup>。DHE は DMSO で 10 mmol/L に溶解して使用した。MEF はあらかじめ AP により 72 時間インキュベートした後、37°C で 10 分間、10  $\mu$ mol/L DHE で処理した。その後、PBS で洗浄した。細胞の蛍光強度は、フローサイトメーター (EPICS ALTRA、ベックマンコールター) を使用して評価した。心筋細胞における細胞内 ROS 産生の評価には、

CM-H<sub>2</sub>DCFDA を使用した。KB 溶液中の心筋細胞に対して、CM-H<sub>2</sub>DCFDA を終濃度 10  $\mu\text{mol/L}$  で添加した。37°C で 10 分間反応後、細胞を KB 溶液で洗浄した。各試験群につき 10,000 個の細胞を使用した。CM-H<sub>2</sub>DCFDA(-)を陰性対照として、陰性対照に相当する蛍光強度の細胞群を除去した残りの細胞を陽性細胞としてカウントした。

#### 5.2.8 DNA 酸化傷害度の測定

心臓核 DNA 中の酸化傷害マーカー 8-oxodG の測定方法は、文献に従った<sup>(19)</sup>。

#### 5.2.9 組織学的解析

組織学的解析は、まず心臓組織を 10%(w/v)ホルマリンに浸漬して固定した。その後脱水、パラフィン固定し、4  $\mu\text{m}$  厚ヘスライスして、ヘマトキシリン-エオシン (HE) 染色を行った。さらに、線維化度を評価するためアザン染色を行った。組織は、10x 対物レンズで VANOX-S 顕微鏡 (オリンパス) と Pixera Pro600EX カメラを使用して撮影した。線維化面積は、Leica Qwin Plus v3 ソフトウェアを用いて定量した。

#### 5.2.10 統計解析

統計解析は、SPSS v11.5 ソフトウェアを使用した。生存率解析における標準誤差および  $P$  値は Log-rank 検定法を使用した。 $P < 0.05$  を有意とした。試験群間の平均値比較は分散分析 (ANOVA) によって行った。試験群間の多重比較は、その後の検定として Tukey 法で行った<sup>(20)</sup>。

### 5.3 結果

#### 5.3.1 リンゴポリフェノール摂取による心筋 Mn-SOD 欠損マウスにおける生存率への影響

心筋 Mn-SOD 欠損マウスを作製し、生存率を測定したところ、生存率は通常の対照マウスと比べて顕著に減少し (Fig. 5.2A, B)<sup>(21)</sup>、平均生存率は  $18.5 \pm 1.0$  週、最大寿命は 22.0 週となった。欠損マウスは 8 週齢以降の体重増加が認められず、進行的な体重減少を示した (14 週齢で、対照マウス群  $24.4 \pm 0.4$  g、欠損マウス群  $20.7 \pm 0.6$  g) (Fig. 5.2C)。欠損マウスは心臓重量が有意に増大した (18 週齢で対照マウス群  $105.4 \pm 4.1$  mg、欠損マウス群  $285.0 \pm 9.6$  mg、 $P < 0.001$ ) (Fig. 5.2D)<sup>(21)</sup>。酸化ストレスによって引き起こされた変化に対する AP 摂取の影響を調査するために、欠損マウスに飲料水として 0.1%(w/v) の AP を含む水を自由摂取させたところ、平均生存率は  $23.8 \pm 0.7$  週、最大寿命は 29.0 週となり、AP を摂取しない欠損マウスと比べて生存率が有意に上昇した ( $P < 0.0001$ ) (Fig. 5.2A, B)<sup>(21)</sup>。AP の摂取は、進行的な体重の減少の遅延を示し、14 週齢で

欠損マウス群  $20.7 \pm 0.6$  g、AP 摂取欠損マウス群  $23.4 \pm 0.7$  g ( $P < 0.01$ )であった(Fig. 5.2C)。AP の摂取は、心臓拡張の遅延を示した(18 週齢で欠損マウス群  $285.0 \pm 9.6$  mg、AP 摂取欠損マウス群  $256.8 \pm 8.0$  mg、 $P < 0.05$ ) (Fig. 5.2D)<sup>(21)</sup>。

### 5.3.2 リンゴポリフェノール摂取による心筋 Mn-SOD 欠損マウスにおける心臓組織への影響

酸化ストレスによる心臓の組織病理学変化に対する AP の影響を検討するために、心臓中の炎症および傷害を反映する血漿中の CPK 値を測定した。18 週齢で対照マウス群  $65.8 \pm 16.9$  IU/L、欠損マウス群  $128.6 \pm 20.8$  IU/L、AP 摂取欠損マウス群  $80.4 \pm 8.7$  IU/L ( $P < 0.05$  vs. 欠損マウス群)であり(Fig. 5.3A)、AP の摂取は欠損マウスにおける CPK 値の上昇を改善した。欠損マウスの LV 横断面の HE およびアザン染色像では、不規則な筋フィラメントおよび多形態性の核を備えた心筋変性、心筋細胞の不規則性、および空胞化が認められた(Fig. 5.3B)。線維化面積は、18 週齢で対照マウス群  $2.1 \pm 0.3\%$ 、欠損マウス群  $9.8 \pm 0.6\%$ 、AP 摂取欠損マウス群  $5.0 \pm 0.7\%$  ( $P < 0.001$  vs. 欠損マウス群)であり(Fig. 5.3C)<sup>(21)</sup>、AP の摂取は心臓組織病理学的な異常変化、および線維化を改善した。

### 5.3.3 リンゴポリフェノールによる培養細胞における酸化ストレスへの影響

AP の培養細胞に対する抗酸化作用を検証するために、細胞透過性を有する細胞内 ROS 検出試薬である CM-H<sub>2</sub>DCFDA を使用して、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 添加により酸化ストレスを誘導した C2C12 細胞の細胞内 ROS レベルを測定した。AP 0 mg/mL 群の蛍光強度を 1 としたとき、AP 1.25 mg/mL 処理群で  $0.72 \pm 0.07$  ( $P < 0.05$  vs. AP 0 mg/mL 群)、AP 6.25 mg/mL 処理群で  $0.16 \pm 0.04$  ( $P < 0.001$  vs. AP 0 mg/mL 群)であり(Fig. 5.4A, B)、培養細胞の AP とのインキュベート処理により AP 用量依存的に ROS 産生量を抑制することを明らかにした。

### 5.3.4 リンゴポリフェノール摂取による Mn-SOD 欠損マウスにおける酸化ストレスへの影響

細胞の内因性 ROS に対する AP の抗酸化作用を検証するために、蛍光プローブ DHE を使用して、タモキシフェンの添加により欠損が誘導された Mn-SOD 欠損 MEF の細胞内 ROS 量を測定した。対照である DMSO 処理群の蛍光強度を 100%としたとき、タモキシフェン処理 AP 0  $\mu$ g/mL 群で  $205.6 \pm 16.7\%$ 、タモキシフェン処理 AP 50  $\mu$ g/mL 群で  $156.0 \pm 15.0\%$  ( $P < 0.05$  vs. AP 0  $\mu$ g/mL 群)、タモキシフェン処理 100  $\mu$ g/mL 群で  $138.9 \pm 11.1\%$  ( $P < 0.01$  vs. AP 0  $\mu$ g/mL 群)であり(Fig. 5.5A, B)、AP とのインキュベート処理は Mn-SOD 欠損 MEF の ROS 産生量を抑制した。また、内因性 ROS に対する AP の経口摂取による抗酸化作用を検証するために、AP を摂取した欠損マウスから単離した心筋細胞内の ROS レベルを測定した(Fig. 5.5C, D)。1 回目の試験で、対照マウス群の蛍光強度は 10.1%、欠損マウス群は 35.8%、AP 0.1%(w/v)摂取欠損マウス群は 22.6%、

AP 0.5%(w/v)摂取欠損マウス群は 26.2%であった(Fig. 5.5D)。2 回目の試験で、対照マウス群の蛍光強度は 9.5%、欠損マウス群は 18.9%、AP 0.1%(w/v)摂取欠損マウス群は 14.6%、AP 0.5%(w/v)摂取欠損マウス群は 12.7%であった(Fig. 5.5D)。2 回の試験において、対照マウス群の蛍光強度に比べて、欠損マウス群は増加し、AP 摂取欠損マウス群は減少した。AP 摂取が Mn-SOD 欠損心筋細胞において ROS 産生量を抑制した。さらに、AP 摂取による生体内での酸化効果を検証するために、心臓組織から抽出した核 DNA 中の 8-oxodG 量を測定したところ、 $10^6$ dG あたりの値が対照マウス群は  $0.92 \pm 0.10$ 、欠損マウス群は  $1.39 \pm 0.14$  ( $P < 0.05$  vs. 対照マウス群)、AP 摂取欠損マウス群は  $1.20 \pm 0.11$  となり(Fig. 5.5E)<sup>(21)</sup>、AP 摂取により減少する傾向が認められた。

## 5.4 考察

ポリフェノールは植物二次代謝産物の一種であり、フェノール性水酸基を分子内に複数有することから抗酸化活性を示すことが知られている<sup>(22)</sup>。本研究では、内因性の酸化ストレスによって引き起こされる組織傷害、老化進行に対する AP の影響を検証するために、心筋 Mn-SOD 欠損マウスへ AP を摂取させたところ、AP 摂取が短命なマウスの生存率を顕著に向上させることが確認された。また、AP は欠損マウスにおける進行的な体重減少を遅延し、心臓拡張および心臓の線維化の進行を抑制した。生存率延長および体重減少の遅延は、進行的な DCM に対する AP の予防効果を表わしていると考えられた。また、心臓の線維化の進行抑制は、心臓機能の維持と関連している可能性が考えられた。

ポリフェノール類に関しては、レスベラトロール、茶カテキン、ケルセチンが虚血再灌流後の心筋症に対する予防効果を示すことが報告されている<sup>(23-28)</sup>。この虚血再灌流障害モデルでは、一過性の急激な酸化ストレス上昇が生体成分の酸化傷害をもたらし、心筋異常の要因となっていることが知られており<sup>(29)</sup>、ポリフェノールによる本モデルでの心筋保護効果は抗酸化作用によるものと推察される。一方、本研究では一過性だけでなく慢性的な酸化ストレスに対する AP の抗酸化効果を検証した。まず、*in vitro* の実験で、AP とのインキュベートは C2C12 培養細胞の過酸化水素によって引き起こされた ROS の産生を抑えることを明らかにした。また、AP とのインキュベートは、内因性で ROS 過剰となる Mn-SOD 欠損 MEF の  $O_2^{\cdot -}$  産生を抑制した。さらに、AP を経口摂取させたマウス個体の心臓から単離した Mn-SOD 欠損心筋細胞でも AP は ROS の産生を抑制した。また、AP 摂取は心臓核の DNA 酸化傷害マーカーを減少させた。以前に、SOD/カタラーゼの模倣物である抗酸化剤 EUK-8 の本欠損マウスへの投与が、ミトコンドリアの酸化ストレスを抑制することにより、心臓病理学的変化と機能障害を改善することが示されている<sup>(19,30)</sup>。食品である AP

の摂取は、抗酸化剤の投与と比べると度合いは小さいが、予防的にミトコンドリアの ROS 産生を抑制し、結果的に老化の進行を緩やかにすると考えられた。

本研究における AP の抗酸化作用の詳細な機序については、検証を行っていないため不明である。C2C12 培養細胞で過酸化水素によって引き起こされた ROS 産生を抑制したことについては、AP の細胞外での ROS の捕捉、または錯体形成による金属からの隔離<sup>(31)</sup>が関与した可能性が挙げられる。PC と同じくフラバン-3-オール(フラバノール)類ポリフェノールである茶カテキン没食子酸エピガロカテキン(EGCG) (Fig. 5.6)は、細胞膜上の受容体 67 kDa ラミニンレセプターに特異的に結合することが報告されている<sup>(32)</sup>。この受容体は、EGCG によるガン細胞株に対する抗ガン作用や、好塩基球細胞株に対する抗アレルギー作用において、これらの作用に関与する細胞内シグナルを仲介している<sup>(32)</sup>。Mn-SOD 欠損細胞で AP のブレインキューベーションが ROS 産生を抑制したことについては、AP が細胞膜上の受容体を介して抗酸化シグナリングに作用する可能性が考えられた。第 4 章では、AP および PC が、線虫で寿命シグナル遺伝子である Sir2 に依存した抗老化作用を示すことを明らかにしている。一方、ほ乳類における Sir2 のホモログである SIRT1 は、抗酸化酵素の発現上昇作用を通じて心不全における心筋保護作用を有することが知られている<sup>(1)</sup>。AP の細胞膜受容体を介した抗酸化作用は、SIRT1 シグナリングによる抗酸化活性上昇の可能性が示唆される。一方で、PC の摂取は血液中の抗酸化性を上昇させることが明らかとなっている<sup>(33)</sup>。また、PC の摂取により、抗酸化に関わるアスコルビン酸、 $\alpha$ -トコフェロール、ビタミン B6 各血中濃度の上昇が認められることから、細胞に対する AP の間接的な抗酸化作用の寄与も考えられる。それを確かめるためには、今後 AP による抗酸化酵素の変動、血中の抗酸化成分の変動の調査が必要である。

本試験での AP 摂取用量は、0.1%(w/v)飲料水の試験群で 100~150 mg/kg/day と測定されている。これをヒトに外挿した場合<sup>(34)</sup>、100~150 mg/day の摂取となり、AP の最大無毒性量 (NOAEL) である >3,000 mg/kg/day<sup>(35)</sup>を大きく下回ることから、安全に無理なく摂取可能な量であることが示唆された。

## 5.5 要約

本章では、内因性の過剰な酸化ストレスによって老化が促進的に進行するモデルマウスの生存率および酸化ストレスに対する AP の影響について検証した。心筋特異的に Mn-SOD を欠損させたマウスを作製し、AP を 0.1%(w/v)配合した飲料水を摂取させ続けたところ、欠損マウス群の平均生存率は 18.5 $\pm$ 1.0 週に対して、AP 摂取群は 23.8 $\pm$ 0.7 週となり、有意に生存率が上昇した ( $P < 0.0001$ )。心臓組織の線維化面積は、18 週齢で対照マウス群 2.1 $\pm$ 0.3%、欠損マウス群 9.8 $\pm$



0.6%、AP 摂取欠損マウス群  $5.0 \pm 0.7\%$  ( $P < 0.001$  vs. 欠損マウス群)となり、AP 摂取により心筋組織の線維化度が有意に低値となった。心臓組織核 DNA の酸化マーカー 8-oxodG 量は、 $10^6$ dG あたりの値が対照マウス群は  $0.92 \pm 0.10$ 、欠損マウス群は  $1.39 \pm 0.14$ 、AP 摂取欠損マウス群は  $1.20 \pm 0.11$  となり、AP 摂取により減少する傾向が認められた。AP を摂取した欠損マウスの心臓より、灌流操作により心筋細胞を単離して、活動細胞が産生する ROS 量を検出試薬を用いて測定したところ、AP 摂取により ROS 産生量は抑制された。以上より、AP の摂取によって生体内の酸化ストレスが軽減されることによって、心筋組織の傷害が抑制され、マウスの生存率が向上した可能性が示唆された。本章では、加齢とともに進行的に過剰となる ROS に対して、AP の摂取がその抗酸化活性によって予防的に抗老化作用をもたらすことを明らかにした。

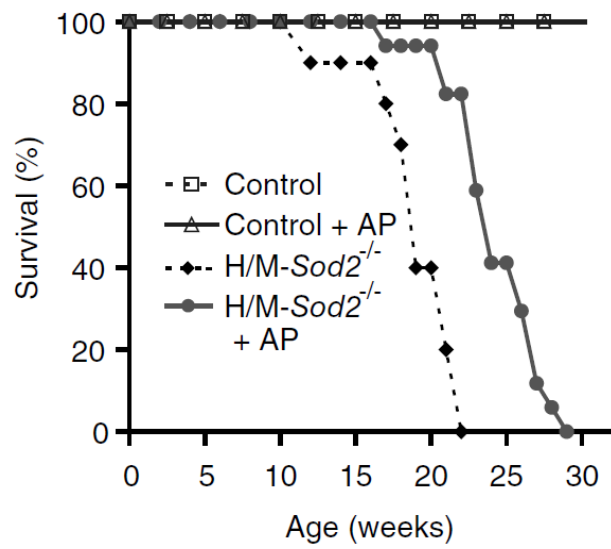
## 5.6 参考文献

1. Alcendor, R.R, Gao, S, Zhai, P, Zablocki, D, Holle, E, Yu, X, Tian, B, Wagner, T, Vatner, S.F, Sadoshima, J. Sirt1 regulates aging and resistance to oxidative stress in the heart. *Circ Res.* **100**, 1512-1521 (2007)
2. Halliwell, B. Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause, or consequence? *Lancet.* **344**, 721-724 (1994)
3. Sohal, R.S., Weindruch, R. Oxidative stress, caloric restriction, and aging. *Science.* **273**, 59-63 (1996)
4. de Souza-Pinto, N.C., Eide, L., Hogue, B.A., Thybo, T., Stevnsner, T., Seeberg, E., Klungland, A., Bohr, V.A. Repair of 8-oxodeoxyguanosine lesions in mitochondrial DNA depends on the oxoguanine DNA glycosylase (OGG1) gene and 8-oxoguanine accumulates in the mitochondrial DNA of OGG1-defective mice. *Cancer Res.* **61**, 5378-5381 (2001)
5. Sohal, R.S., Agarwala, S., Candasa, M., Forsterb, M.J., H., L. Effect of age and caloric restriction on DNA oxidative damage in different tissues of C57BL/6 mice. *Mech Ageing Dev.* **76**, 215-224 (1994)
6. Lucas, D.T., Szweda, L.I. Cardiac reperfusion injury: aging, lipid peroxidation, and mitochondrial dysfunction. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **95**, 510-514 (1998)
7. van der Loo, B., Bachschmid, M., Spitzer, V., Brey, L., Ullrich, V., Luscher, T.F. Decreased plasma and tissue levels of vitamin C in a rat model of aging: Implications for antioxidative defense. *Biochem Biophys Res Commun.* **303**, 483-487 (2003)
8. Lakatta, E.G. Arterial and cardiac aging: Major shareholders in cardiovascular disease enterprises. Part III: Cellular and molecular clues to heart and arterial aging. *Circulation.* **107**, 490-497 (2003)
9. 浅田浩二. SOD の生物、細胞内分布と機能. SOD の新知見 構造、機能と診断、治療へのかかわり. 勝部幸輝, 谷口直之編集. メディカルトリビューン. 東京. p.p. 11-22 (1990)
10. Hiroi, S., Harada, H., Nishi, H., Satoh, M., Nagai, R., Kimura, A. Polymorphisms in the SOD2 and HLA-DRB1 genes are associated with nonfamilial idiopathic dilated cardiomyopathy in Japanese. *Biochem Biophys Res Commun.* **261**, 332-339 (1999)
11. Valenti, L., Conte, D., Piperno, A., Dongiovanni, P., Fracanzani, A.L., Fraquelli, M., Vergani, A.,

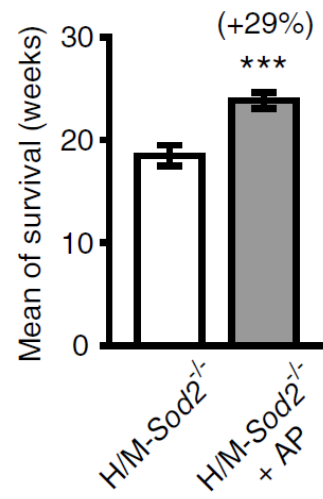
- Gianni, C., Carmagnola, L., Fargion, S. The mitochondrial superoxide dismutase A16V polymorphism in the cardiomyopathy associated with hereditary haemochromatosis. *J Med Genet* **41**, 946-950 (2004)
12. Li, Y., Huang, T.T., Carlson, E.J., Melov, S., Ursell, P.C., Olson, J.L., Noble, L.J., Yoshimura, M.P., Berger, C., Chan, P.H., Wallace, D.C., Epstein, C.J. Dilated cardiomyopathy and neonatal lethality in mutant mice lacking manganese superoxide dismutase. *Nat Genet.* **11**, 376-381 (1995)
  13. Lebovitz, R.M., Zhang, H., Vogel, H., Cartwright, J.J., Dionne, L., Lu, N., Huang, S., Matzuk, M.M. Neurodegeneration, myocardial injury, and perinatal death in mitochondrial superoxide dismutase-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **93**, 9782-9787 (1996)
  14. Nojiri, H., Shimizu, T., Funakoshi, M., Yamaguchi, O., Zhou, H., Kawakami, S., Ohta, Y., Sami, M., Tachibana, T., Ishikawa, H., Kurosawa, H., Kahn, R.C., Otsu, K., Shirasawa, T. Oxidative stress causes heart failure with impaired mitochondrial respiration. *J Biol Chem.* **281**, 33789-33801 (2006)
  15. 食品と開発編集部. 抗酸化能指標統一化に向けた動向と測定装置・キット・サービス. *食品と開発*. **48**, 33-36 (2013)
  16. Badea, T.C., Wang, Y., Nathans, J. A noninvasive genetic/pharmacologic strategy for visualizing cell morphology and clonal relationships in the mouse. *J Neurosci.* **23**, 2314-2322 (2003)
  17. Suzuki, M., Sasaki, N., Miki, T., Sakamoto, N., Ohmoto-Sekine, Y., Tamagawa, M., Seino, S., Marban, E., Nakaya, H. Role of sarcolemmal K(ATP) channels in cardioprotection against ischemia/reperfusion injury in mice. *J Clin Invest.* **109**, 509-516 (2002)
  18. Bindokas, V.P., Jordan, J., Lee, C.C., Miller, R.J. Superoxide production in rat hippocampal neurons: selective imaging with hydroethidine. *J Neurosci.* **16**, 1324-1336 (1996)
  19. Kawakami, S., Matsuda, A., Sunagawa, T., Noda, Y., Kaneko, T., Tahara, S., Hiraumi, Y., Adachi, S., Matsui, H., Ando, K., Fujita, T., Maruyama, N., Shirasawa, T., Shimizu, T. Antioxidant, EUK-8, prevents murine dilated cardiomyopathy. *Circ J.* **73**, 2125-2134 (2009)
  20. Ludbrook, J. Multiple comparison procedures updated. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* **25**, 1032-1037 (1998)
  21. アサヒグループホールディングス ニュースリリース 日本農芸化学会 2013 年度大会で発表りんごポリフェノールが老化の進行を抑制 ～マウスの寿命延長効果、生体内での抗酸化作用を初めて確認～. 2013 年 03 月 08 日.  
<http://www.asahigroup-holdings.com/news/2013/0308.html>.
  22. 食品の抗酸化機能, 老化抑制と食品. 食品総合研究所編集, アイピーシー, 東京, p.p.11-12 (2002)
  23. Aneja, R., Hake, P.W., Burroughs, T.J., Denenberg, A.G., Wong, H.R., Zingarelli, B. Epigallocatechin, a green tea polyphenol, attenuates myocardial ischemia reperfusion injury in rats. *Mol Med.* **10**, 55-62 (2004)
  24. Bartekova, M., Carnicka, S., Pancza, D., Ondrejckova, M., Breier, A., Ravingerova, T. Acute treatment with polyphenol quercetin improves postischemic recovery of isolated perfused rat hearts after global ischemia. *Can J Physiol Pharmacol.* **88**, 465-471 (2010)
  25. Facino, R.M., Carini, M., Aldini, G., Berti, F., Rossoni, G., Bombardelli, E., Morazzoni, P. Diet enriched with procyanidins enhances antioxidant activity and reduces myocardial post-ischaemic damage in rats. *Life Sci.* **64**, 627-642 (1999)
  26. Mokni, M., Limam, F., Elkahoui, S., Amri, M., Aouani, E. Strong cardioprotective effect of resveratrol, a red wine polyphenol, on isolated rat hearts after ischemia/reperfusion injury. *Arch*

- Biochem Biophys.* **457**, 1-6 (2007)
27. Potenza, M.A., Marasciulo, F.L., Tarquinio, M., Tiravanti, E., Colantuono, G., Federici, A., Kim, J.A., Quon, M.J., Montagnani, M. EGCG, a green tea polyphenol, improves endothelial function and insulin sensitivity, reduces blood pressure, and protects against myocardial I/R injury in SHR. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* **292**, E1378-1387 (2007)
  28. Yoshida, Y., Shioi, T., Izumi, T. Resveratrol ameliorates experimental autoimmune myocarditis. *Circ J.* **71**, 397-404 (2007)
  29. Opie, L.H. Reperfusion injury and its pharmacologic modification. *Circulation.* **80**, 1049-1062 (1989)
  30. Makino, N., Maeda, T., Oyama, J., Sasaki, M., Higuchi, Y., Mimori, K., Shimizu, T. Antioxidant therapy attenuates myocardial telomerase activity reduction in superoxide dismutase-deficient mice. *J Mol Cell Cardiol.* **50**, 670-677 (2011)
  31. Brown, J.E., Khodr, H., Hider, R.C., Rice-Evans, C.A. Structural dependence of flavonoid interactions with Cu<sup>2+</sup> ions: implications for their antioxidant properties. *Biochem J.* **330**, 1173-1178 (1998)
  32. Tachibana, H., Koga, K., Fujimura, Y., Yamada, K. A receptor for green tea polyphenol EGCG. *Nat Struct Mol Biol.* **11**, 380-381 (2004)
  33. Williamson, G., Manach, C. Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. II. Review of 93 intervention studies. *Am J Clin Nutr.* **81**, 243S-255S (2005)
  34. 安原一, 小林真一. 非臨床(前臨床)試験での薬効評価, 続医薬品の開発 第8巻 薬効評価. 中島光好編集, 廣川書店, 東京. p.p.7-18 (1997)
  35. Fujiwara, K., Nakashima, S., Sami, M., Kanda, T. Ninety-day dietary toxicity study of apple polyphenol extracts in Ctl: CD (SD) rats. *Food Chem Toxicol.* **56C**, 214-222 (2013)

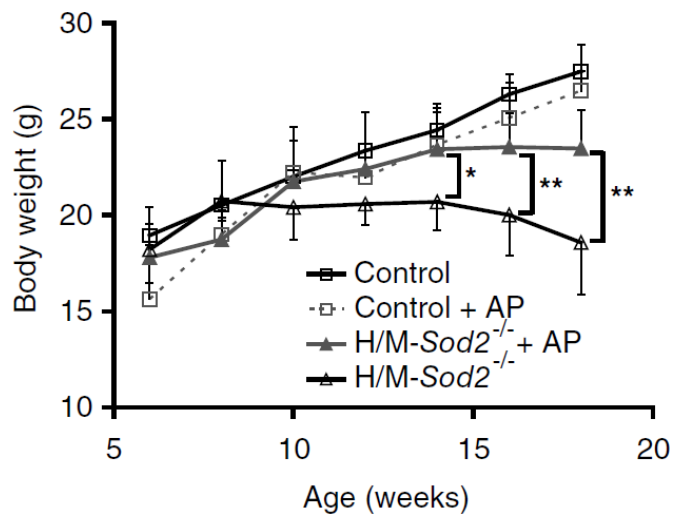
A



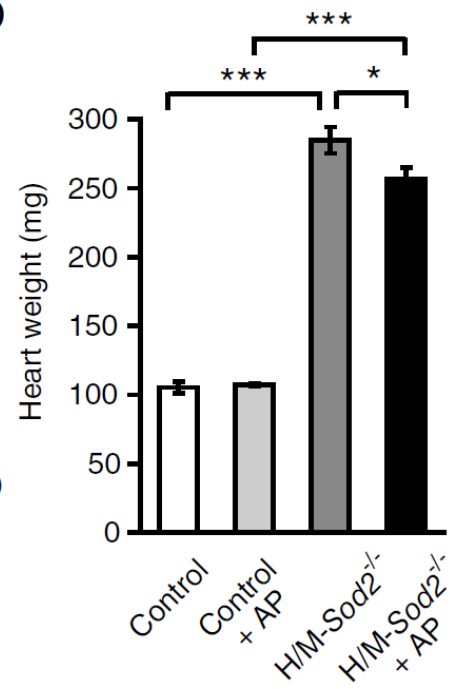
B



C



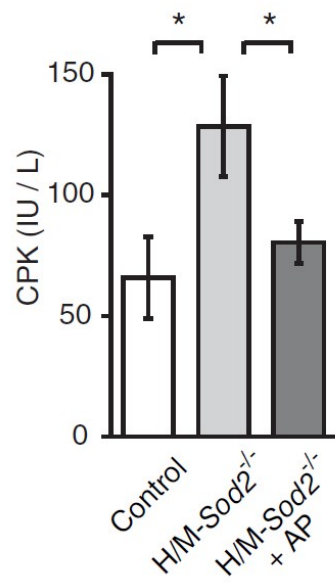
D



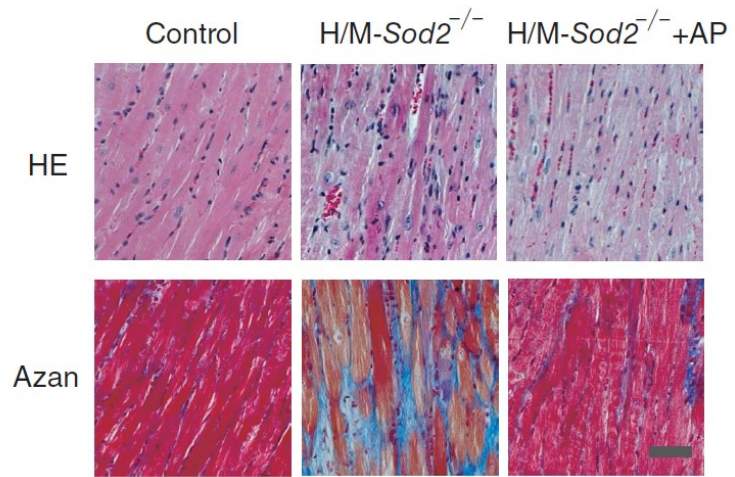
**Fig. 5.2** AP extends the lifespan of H/M-*Sod2*<sup>-/-</sup> mice.

**A,B**, Survival curves and the mean lifespan of male H/M-*Sod2*<sup>-/-</sup> mice. The maximum lifespan of the H/M-*Sod2*<sup>-/-</sup> mice was about 22 weeks. The intake of AP extended their mean lifespan by 29% compared with water alone. Control,  $n = 10$ ; Control+AP,  $n = 10$ ; H/M-*Sod2*<sup>-/-</sup>,  $n = 10$ ; H/M-*Sod2*<sup>-/-</sup>+AP,  $n = 17$ . Values are mean  $\pm$  SE, \*\*\* $P < 0.0001$ . The data were reproduced from reference<sup>(21)</sup>. **C**, Body weights of male H/M-*Sod2*<sup>-/-</sup> mice. Dietary AP delayed the progressive weight loss of the H/M-*Sod2*<sup>-/-</sup> mice. Values are mean  $\pm$  SEM,  $n = 7$ . Differences between groups, \*\* $P < 0.01$ , \* $P < 0.05$ . **D**, Heart weights of 18-week-old female H/M-*Sod2*<sup>-/-</sup> mice. The hearts of the H/M-*Sod2*<sup>-/-</sup> mice were heavier than those of the control mice. Dietary AP decreased their heart weight. Values are mean  $\pm$  SEM. Control,  $n = 8$ ; Control + AP,  $n = 9$ ; H/M-*Sod2*<sup>-/-</sup>,  $n = 15$ ; and H/M-*Sod2*<sup>-/-</sup> + AP,  $n = 15$ . Differences between groups, \*\*\* $P < 0.001$ , \* $P < 0.05$ . The data were reproduced from reference<sup>(21)</sup>.

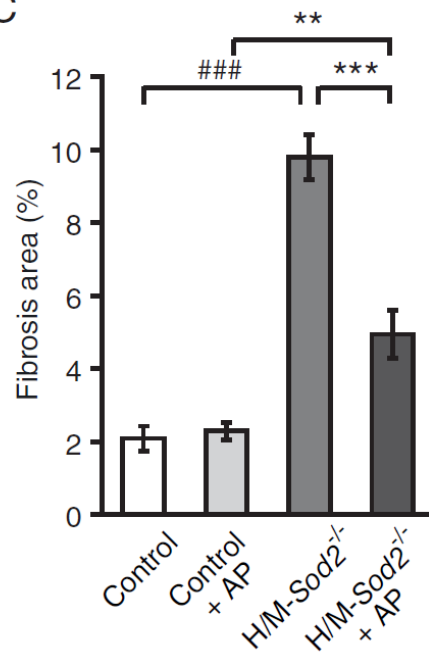
A



B

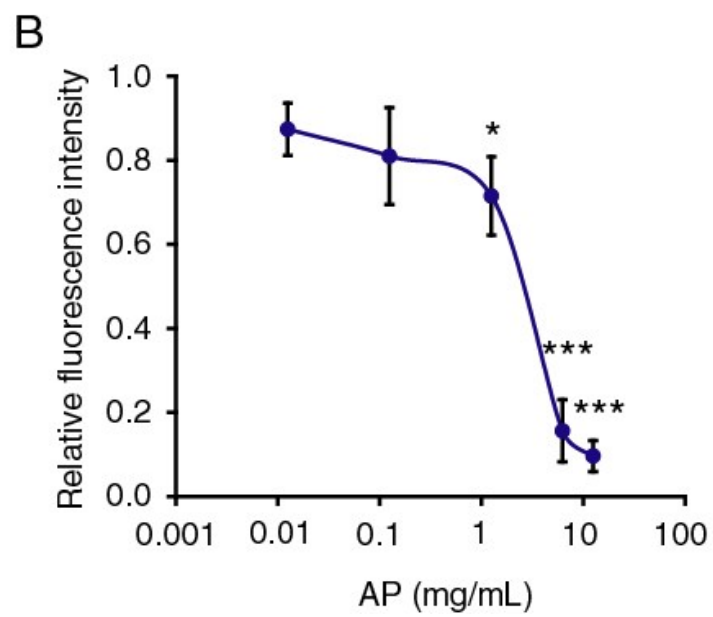
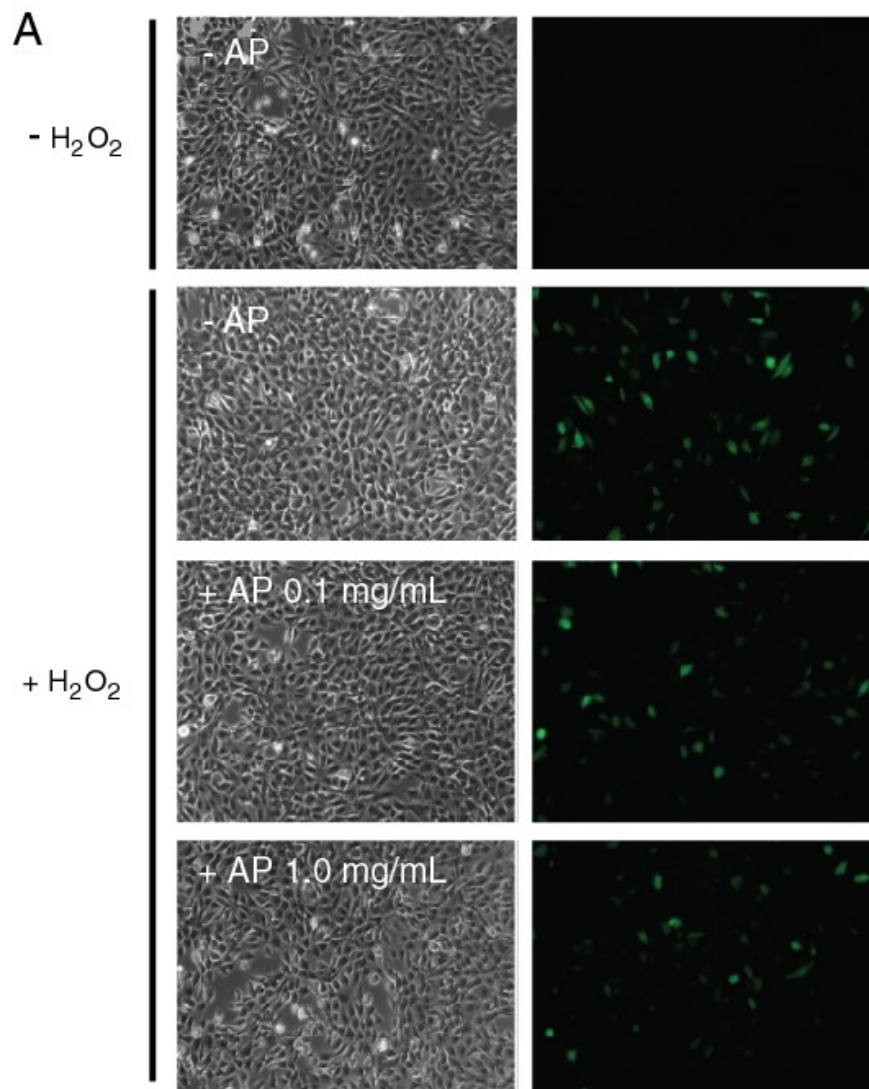


C



**Fig. 5.3** AP ameliorates the heart histopathology of H/M-*Sod2*<sup>-/-</sup> mice.

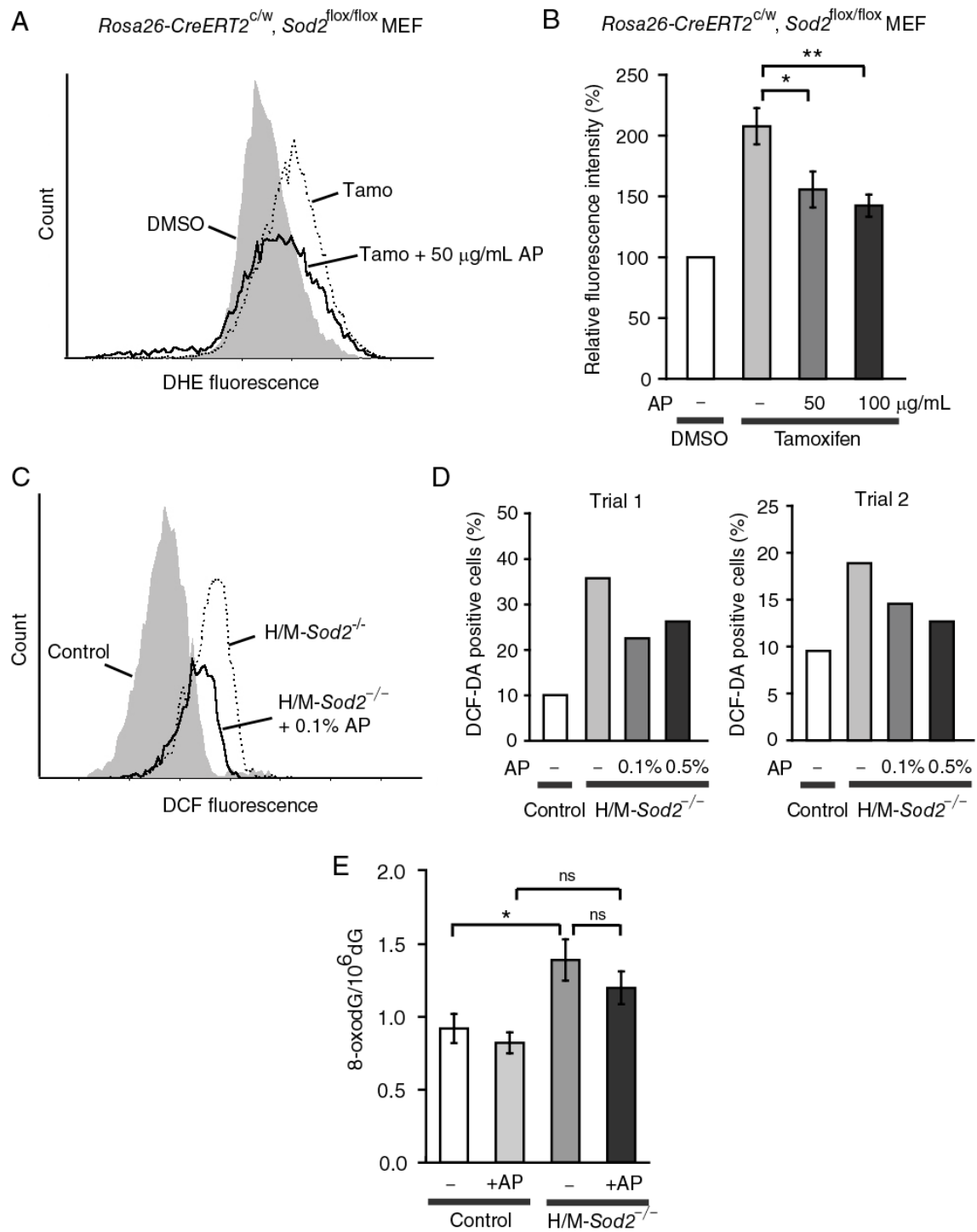
**A**, Serum CPK concentration of H/M-*Sod2*<sup>-/-</sup> mice. Serum CPK has been reported to be a blood biomarker that reflects cardiac pathology. The H/M-*Sod2*<sup>-/-</sup> male mice treated with AP displayed reduced serum CPK levels. Values are mean value  $\pm$  SEM,  $n = 6\sim7$ . Differences between groups,  $*P < 0.05$ . **B**, HE and azan stained transverse sections of LV walls. LV walls from male H/M-*Sod2*<sup>-/-</sup> mice showed myocardial degeneration, cardiomyocyte disarray, and vacuolization with irregular myofilaments and pleomorphic nuclei. Azan staining revealed diffuse myocardial fibrosis (blue). AP administration ameliorated the symptoms of the H/M-*Sod2*<sup>-/-</sup> mice. The scale bar represents 10  $\mu\text{m}$ . **C**, The fibrotic areas of the LV walls from the H/M-*Sod2*<sup>-/-</sup> mice treated with AP were significantly decreased compared with those of the control mice. Values are mean value  $\pm$  SEM,  $n = 4$ . Differences between groups,  $###P < 0.0001$ ,  $***P < 0.001$ ,  $**P < 0.01$ . The data were reproduced from reference<sup>(21)</sup>.





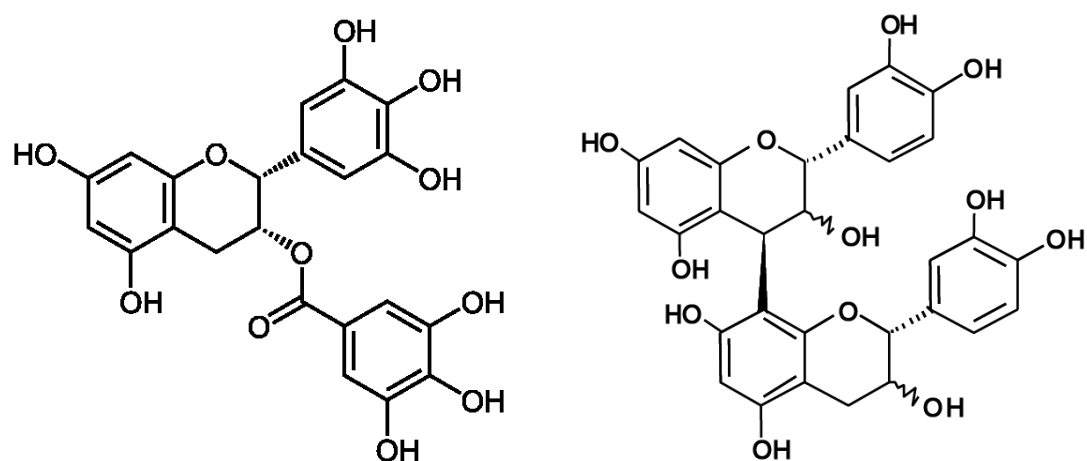
**Fig. 5.4** AP has anti-oxidant effects *in vitro*.

**A**, Anti-oxidative effect of AP on mouse C2C12 myoblast cells. The cells were preincubated for 30 min with 0.1 mg/mL or 1.0 mg/mL AP and then incubated for another 1 h with 200  $\mu$ mol/mL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. The cells were incubated with 10  $\mu$ M CM-H<sub>2</sub>DCFDA for 20 min at 37°C. After the incubation, the cells were photographed using a fluorescence microscopy imaging system. ROS production was induced in the cells treated with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, as assessed by DCF fluorescence. **B**, Relative fluorescence intensity of C2C12 myoblast cells treated with AP. AP treatment decreased the production of ROS. Values are mean value  $\pm$  SEM,  $n = 4$ . \*\*\* $P < 0.001$ , \* $P < 0.05$  vs. AP 0  $\mu$ g/mL.



**Fig. 5.5** AP has anti-oxidant effects *in vivo*.

**A**, Frequency histogram of tamoxifen-induced Mn-SOD deficient MEF treated with DHE. After being incubated with 10  $\mu\text{mol/L}$  DHE at 37°C for 30 minutes, the fluorescence intensity of the cells was assessed using a flow cytometer. Data for 10,000 MEF were acquired for each group. **B**, Proportion of DHE fluorescence positive MEF. ROS production was induced in the MEF from the tamoxifen-induced Mn-SOD deficient mice. Preincubation with 50  $\mu\text{g/mL}$  or 100  $\mu\text{g/mL}$  AP decreased the production of ROS. Values are mean value  $\pm$  SEM,  $n = 8$ .  $**P < 0.01$ ,  $*P < 0.05$  vs. MEF treated with tamoxifen and AP 0  $\mu\text{g/mL}$ . **C**, Frequency histogram of isolated cardiomyocytes treated with CM-H<sub>2</sub>DCFDA. After being incubated with 10  $\mu\text{mol/L}$  CM-H<sub>2</sub>DCFDA at 37°C for 10 minutes, DCF fluorescence intensity was assessed using a flow cytometer. Data for 10,000 cardiomyocytes were acquired for each group. **D**, Proportion of DCF fluorescence positive cardiomyocytes in the H/M-*Sod2*<sup>-/-</sup> mice. ROS production was induced in isolated myocytes in the H/M-*Sod2*<sup>-/-</sup> mice, as assessed by DCF fluorescence. The intake of 0.1%(w/v) or 0.5%(w/v) AP decreased the production of ROS. **E**, Level of 8-oxodG in the cardiac cell nuclei of the H/M-*Sod2*<sup>-/-</sup> mice. The proportion of 8-oxodG/10<sup>6</sup> dG in their nuclear fractions is shown. The nuclear oxidant level was increased in the H/M-*Sod2*<sup>-/-</sup> mice, and the intake of AP decreased it. Values are mean value  $\pm$  SEM,  $n = 13\sim 14$ . Differences between groups,  $*P < 0.05$ . The data were reproduced from reference<sup>(21)</sup>.



**Fig. 5.6** Structure of epigallocatechin gallate (EGCG, left) and apple procyanidin (PC) B-type dimer (right). Flavan-3-ol compounds include the EGCG and PC.

## 第 6 章

### リンゴポリフェノールの心筋特異的 Mn-SOD 欠損マウスにおける 電気生理学的変化および不整脈発生率への影響

#### 6.1 緒言

本論文の第 5 章では、心筋特異的にマンガン-スーパーオキシドジスムターゼ(Mn-SOD)を欠損させ酸化ストレスが増大するマウス(H/M-*Sod2*<sup>-/-</sup>)を作製し、リンゴポリフェノール(AP)を摂取させたところ、生存率が上昇した。同時に、心臓組織の線維化度、心臓組織核 DNA の酸化マーカー量は減少し、単離心筋細胞が産生する ROS 量は抑制された。以上より、加齢とともに進行的に過剰となる活性酸素種(ROS)に対して、AP の摂取がその抗酸化作用によって予防的に抗老化作用をもたらすことを明らかにした。しかし、AP による生存率向上作用について、その詳細な作用機序は明らかではない。

不整脈は、加齢にともない増大する健康リスクの 1 つである。心室性不整脈の発生率は心臓疾患患者において増大するが、心室性不整脈の一種である心室性期外収縮の発生率は健常者では加齢にともなって上昇する<sup>(1-3)</sup>。加齢にともない進行する ROS の生成増加と抗酸化能力の損失は、加齢に関連した心機能の異常へ関与することが報告されている<sup>(4-6)</sup>。H/M-*Sod2*<sup>-/-</sup>マウスでのミトコンドリアにおける ROS の過剰生成は、心臓の機械的な機能障害、すなわち鬱血性心不全につながっているが<sup>(7)</sup>、心臓の電気生理学的な変化については明らかではない。また、ROS の急性的な上昇と心臓電気生理学との関連性はこれまで報告されているが<sup>(8-11)</sup>、慢性的な ROS によって引き起こされる電気生理学的変化については、これまでよく評価されていない。

本章では、まず酸化ストレスに慢性的に被曝されたモデルとして H/M-*Sod2*<sup>-/-</sup>マウスを使用し、その心臓電気生理学的な変化、および心室性不整脈の発生頻度について評価した。さらに、第 5 章での AP による生存率向上について、その作用機序を詳細に理解するために、本マウスにおける AP の心臓における電気生理学的変化、および不整脈発生率に対する影響について検証した。

#### 6.2 材料および方法

### 6.2.1 試薬

AP、PC およびモノマー画分の調製および分析方法は、第 2 章 2.1.1 に準拠した。

### 6.2.2 使用動物

心筋 Mn-SOD 欠損マウス(H/M-*Sod2*<sup>-/-</sup>)および対照マウス(*Sod2*<sup>fllox/fllox</sup>)の作製、遺伝子型の確認、飼育、および AP の投与は、第 5 章 5.2.2 の記載と同様に行った。

### 6.2.3 心電図測定

マウスは 23~25 週齢のメスを用いた。体表面心電図(electrocardiograms, ECG)は、麻酔としてウレタン(SIGMA) 20%(w/v-NaCl 0.9%(w/v))溶液を用量 1.5 g/kg-体重となるよう腹腔内投与し、針電極を用いて測定した。電位変化増幅器(Dual-beam memory oscilloscope VC-10、日本光電)を用いて増幅し、ECG 波形を得た。心電図解析ソフト Chart5 for Windows (PowerLab® System, ADInstruments)を用いて記録した。RR、PQ、QRS、および QT 間隔を測定し、J 波振幅値は R 波振幅値で補正した。H/M-*Sod2*<sup>-/-</sup>マウスでは、T 波形状の変化が顕著であったため、T 波が P 波と重複して測定不能となった個体については、QT 間隔の解析から除外した。

### 6.2.4 心室性不整脈誘発試験

*in vivo* における心室性不整脈誘発試験は、23~25 週齢のメスを用いて、ウレタン麻酔下で開胸し実施した。試験中は、体温をモニタリングしながらライトの照射により 37°C へ保ち、人工呼吸器(Respirator SN-480-7, シナノ製作所)を用いて人工呼吸下で実施した。二極の刺激電極を露出させた左心室(left ventricular, LV)表面へ接触させた。プログラムパルス装置(Cardiac Stimulator SEC-2102, 日本光電)を用いて持続時間 1 ms の方形パルスを与えることにより、閾値電流を決定した。LV へ刺激を与えたときに、心臓全体を伝導できなくなった最長の早期刺激(premature stimulus)の連結間隔(coupling interval)を、LV の有効不応期(effective refractive period, ERP)と定義し、16 回の基本刺激(S1S1: 75 ms)後、1 回の短間隔刺激(S1S2: premature stimulus, 50 ms)を 1 サイクルとして(75 ms×16 + 50 ms×1)、以降 S1S2 を 50 ms から順次 2 ms ずつ減少させ、ERP が出現するまでサイクルを繰り返した。電流量は、閾値電流の 2 倍とし、持続時間を 1 ms とした。左心室頻回刺激(LV burst stimulation)による心室性不整脈誘発試験は以下のように行った。連続パルス装置(Electronic Stimulator SEN-7203, 日本光電)を用いて、30 回の基本刺激(S1S1: 100 ms)後、個体毎に決定した ERP を基にする 5 回の短間隔刺激(S1S2: premature stimulus, (ERP+2) ms)を 1 サイクルとして(100 ms×30 + (ERP+2) ms×5)、各サイクルの回復時間を 30 s と

して、5 サイクル繰り返した。電流量は、閾値電流の 2 倍とし、持続時間を 1 ms とした。premature stimulus 後に通常の心拍リズムと異なる異所性の拍動が、少なくとも 10 回以上発生した場合、心室頻拍(ventricular tachycardia, VT)と定義した。premature stimulus 後に短く断片的な拍動が、少なくとも 1 s 以上発生した場合、心室細動(ventricular fibrillation, VF)と定義した。

#### 6.2.5 心筋細胞分離を用いたパッチクランプ試験

マウスは 18~22 週齢のメスを用いた。LV 心尖部(apex)の心筋細胞分離は、第 5 章 5.2.6 の記載と同様に行った。心筋細胞の活動電位および膜電流は、ホールセルパッチクランプ法により測定し<sup>(12)</sup>、活動電位はカレントクランプモード、電流はボルテージクランプモードで測定した。細胞を測定用チャンバーへ入れ、細胞外溶液を 1 mL/min の速度で表面灌流した。パッチクランプ電極ピペットは、ガラスキャピラリー(#7056, Corning)を vertical puller(PC-10, Narishige)を用いて 2 段引きして作製した。電極へピペット溶液を満したときの電気抵抗値は 2~4 M $\Omega$  の範囲であった。電極ピペットを Patch/Whole Cell Clamp Amplifier CEZ-2400(日本光電)へ接続し、pCLAMP 9.0(Axon Instruments)を用いてデータの記録および解析を実施した。電極ピペットを細胞膜へ密着させて、電極-灌流液間の抵抗が G $\Omega$  レベルとなる G $\Omega$  シールを形成した後に、電極ピペット内を陰圧にし、細胞膜に孔を開けた。活動電位および内向き整流性カリウム電流( $I_{K1}$ )の測定に用いた標準電極液組成(mmol/L)は以下の通り: KOH 110, L-aspartate 110, KCl 20, MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O 1.0, ATP K<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 5.0, phosphocreatine K<sub>2</sub> 5.0, EGTA 10, HEPES 5.0, および CaCl<sub>2</sub> 1.42, KOH で pH 7.4 へ調製。活動電位および  $I_{K1}$  の測定には、HEPES-Tyrode 溶液を細胞へ表面灌流した。組成(mmol/L)は以下の通り: NaCl 143, KCl 5.4, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O 0.5, MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O 0.33, CaCl<sub>2</sub> 1.8, グルコース 5.5, および HEPES 5.0, NaOH で pH 7.4 に調整。静止膜電位(resting membrane potential)、および 1 ms の脱分極電流の導入により誘発される活動電位(action potential)を記録した。脱分極時のピーク活動電位に対して 50%および 90%に再分極するまでの活動電位持続時間(action potential duration, APD<sub>50</sub> および APD<sub>90</sub>)の解析には、膜電位が非誘発時にも上昇する自動能(automaticity)細胞を除外した細胞を用いた。外向き電位依存性カリウム電流の測定は、HEPES-Tyrode 溶液を表面灌流し、標準電極液を用いてパッチクランプへ供した後、表面灌流液を以下の溶液へ置換して測定した。組成(mmol/L)は以下の通り: KCl 5.4, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.33, atropine sulphate·H<sub>2</sub>O 0.005, CoCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O 2.0, choline Cl 143, MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O 0.5, glucose 5.5, HEPES 5.0, および CaCl<sub>2</sub> 1.8, KOH で pH 7.4 へ調製。外向きカリウムピーク電流( $I_{peak}$ )は、300 ms のステップワイズのパルス電圧開始 2 ms 後の電流値と定義した。外向きカリウム定常電流( $I_{ss}$ )は、300 ms のステップワイズのパルス電圧終了直前の電流値と定義した。内向き電位依存性 L-型カルシウム電流( $I_{Ca}$ )の測定には、HEPES-Tyrode 溶液を細胞へ表面灌流し、 $I_{Ca}$  測定用電極液を用いてパッチ

クランプへ供した後、表面灌流液を  $I_{Ca}$  測定用灌流溶液( $Ca^{2+}$ -containing,  $K^{+}$ -free)へ置換して測定した。 $I_{Ca}$  測定用灌流溶液の組成(mmol/L)は以下の通り: NaCl 143, CsCl 5.4,  $NaH_2PO_4$  0.33,  $MgCl_2 \cdot 6H_2O$  0.5,  $CaCl_2$  1.8, glucose 5.5, および HEPES 5.0, NaOH で pH 7.4 へ調製。 $I_{Ca}$  測定用電極液の組成(mmol/L)は以下の通り: CsOH $\cdot$ H $_2$ O 110, L-aspartate 110, CsCl 20,  $MgCl_2 \cdot 6H_2O$  1.0, ATP  $K_2 \cdot 2H_2O$  5.0, EGTA 10, および HEPES 5.0, CsOH で pH 7.4 へ調製。 $I_{Ca}$  は、350 ms のステップワイズのパルス電圧によって生じる内向き電流のピーク値と定義した。全ての電気生理学的評価試験は、 $36 \pm 0.5^\circ C$  で実施した。細胞膜容量(capacitance)は、0 mV から -5 mV/2.5 ms の斜面波を与えたときの定常電流値を測定して算出した。計測された電流値を各細胞の膜容量で補正して、電流密度を算出した。

#### 6.2.6 コネキシン 43 のウェスタンブロットおよび免疫染色

タンパク試料は、50 mmol/L Tris-HCl (pH 7.4)、150 mmol/L NaCl、5 mmol/L EDTA、1%(w/v) Triton-X 100、およびプロテアーゼ阻害剤(Roche)から成る抽出バッファーを使用して、LV 組織から調製した。タンパク濃度は、DC タンパク質測定キット(BioRad)を用いて測定した。タンパク質は SDS-PAGE によって分離し、PVDF 膜へ転写後、connexin 43(Cx43)抗体(希釈率 1:1000; Cell Signaling)およびアクチン抗体(1:2500; SIGMA)でプローブした。2 次抗体には horseradish peroxidase 標識抗体を用いた。検出には ECL(GE Healthcare)を用いた。パラフィン包埋切片の免疫組織染色は、以下のように行った。心臓組織を 10%(w/v)ホルマリンに浸漬して固定し、脱水、パラフィン固定し、4  $\mu m$  厚で薄片を調製した。その後、キシレンおよびエタノール処理により脱パラフィンおよび再水和を行った。クエン酸ナトリウムバッファー(pH 6.0)に浸漬し、電子レンジによりマイクロ波を照射して煮沸し、その後  $99^\circ C$  のオイルバス中で加熱して、抗原の賦活化を行った<sup>(13)</sup>。スライドを水洗、PBS でリンスし、タンパクブロッッキング溶液とのインキュベート後、1 次抗体 Invitrogen Connexin 43 polyclonal antibody (1:100; Life Technologies Corporation)と  $4^\circ C$ 、オーバーナイトでインキュベートした。洗浄後、2 次抗体 Alexa488 ヤギ抗ウサギ IgG 抗体(1:100; Life Technologies Corporation)とインキュベートした。発色強度は、マウス各個体につき左心室の 14 枚の顕微鏡写真を用いて解析した。

#### 6.2.7 統計解析

統計解析は、SPSS v11.5 ソフトウェアを使用した。 $P < 0.05$  を有意とした。生存率解析における標準誤差および  $P$  値は Log-rank 検定法を使用した。試験群間の平均値比較は分散分析 (ANOVA) によって行った。試験群間の多重比較は、その後の検定として Tukey 法で行った<sup>(14)</sup>。直接確率検定は  $\chi^2$  検定法を用いて比較した。



## 6.3 結果

### 6.3.1 リンゴポリフェノール摂取による心筋 Mn-SOD 欠損マウスの心電図への影響

メスの心筋 Mn-SOD 欠損マウスの生存率を測定した。成果の概要を Fig. 6.1 に示す。通常の対照マウスと比べて顕著に減少し(Fig. 6.1A)、平均生存率は  $22.1 \pm 1.9$  週( $n = 13$ )となった。欠損マウスは体重当たりの心臓重量が有意に増大した( $P < 0.001$ )(Fig. 6.1B)。欠損マウスに飲料水として 0.1%(w/v)の AP を含む水を自由摂取させたところ、平均生存率は  $37.9 \pm 2.0$  週( $n = 15$ )となり、AP を摂取しない欠損マウスと比べて生存率が有意に上昇した( $P < 0.0001$ )(Fig. 6.1A)。AP 摂取は、心臓拡張を抑制した( $P < 0.05$ )(Fig. 6.1B)。

23~25 週齢メスの体表面 ECG を測定したところ、欠損マウスでは、QRS、QT 間隔の延長、および J 波の平坦化が観察された(Fig. 6.1C)。心室の興奮伝導を示す QRS 間隔は、欠損マウスで、対照マウスと比べて有意な延長が認められた( $P < 0.0001$ )(Fig. 6.1D)。AP 摂取欠損マウスで、欠損マウスと比べて有意な短縮が認められた( $P < 0.05$ )。心房から心室までの興奮伝導を示す PQ 間隔は、各試験群間で有意な差は認められなかった(Fig. 6.1E)。QT 間隔は、欠損マウスで、対照マウスと比べて有意な延長が認められた( $P < 0.0001$ )(Fig. 6.1F)。AP 摂取欠損マウスで、欠損マウスと比べて有意な差は認められなかった。

### 6.3.2 リンゴポリフェノール摂取による心室有効不応期および心室性不整脈発生頻度への影響

23~25 週齢メスの ERP を測定した結果を Fig. 6.2B に示す。ERP は、欠損マウスで対照マウスと比べて有意な延長が認められた(対照マウス:  $28.6 \pm 1.0$  ms,  $n = 7$ , 欠損マウス:  $42.0 \pm 2.0$  ms,  $n = 13$ ,  $P < 0.0001$ )。AP 摂取欠損マウスで、欠損マウスと比べて有意な短縮が認められた( $P < 0.05$ )。LV 頻回刺激による心室性不整脈誘発試験で、欠損マウスで対照マウスと比べて VT または VF の発生率が有意に増大し、19 個体中 12 匹で発生し、発生率は 63.2%であった( $P < 0.001$ )。AP 摂取欠損マウスで欠損マウスと比べて VT または VF の発生率が有意に減少し、17 個体中 5 匹で発生し、発生率は 35.7%であった( $P < 0.05$ )。

### 6.3.3 リンゴポリフェノール摂取による心室筋細胞の活動電位への影響

AP 摂取による不整脈誘発試験における発生率低下メカニズムを明らかにするため、LV からコラゲナーゼを用いて単離した心筋細胞を用いてホールセルパッチクランプ法により電気生理的評価を行った。細胞膜面積を反映する細胞膜容量を測定した結果を Fig. 6.3A に示す。欠損マウス

の細胞膜容量は対照マウスと比べて有意に増大した(対照マウス:  $148.9 \pm 5.1$  pF, 欠損マウス:  $223.2 \pm 5.6$  pF,  $P < 0.001$ )。AP 摂取欠損マウスの細胞膜容量は欠損マウスと比べて有意に減少した( $206.8 \pm 7.1$  pF,  $P < 0.05$ )。

活動電位変化をカレントクランプモードで測定した結果を Fig. 6.3B に示した。欠損マウスで対照マウスと比べて、活動電位持続時間は  $APD_{50}$ 、 $APD_{90}$  のいずれも有意に延長した( $APD_{90}$ : 対照マウス:  $35.4 \pm 2.9$  ms,  $n = 49$ , 欠損マウス:  $110.8 \pm 17.5$  ms,  $n = 32$ ,  $P < 0.001$ )(Fig. 6.3C)。AP 摂取欠損マウスで欠損マウスと比べて有意に短縮した( $APD_{50}$ ;  $P < 0.01$ ,  $APD_{90}$ ;  $P < 0.001$ )。静止膜電位の絶対値は、欠損マウスで対照マウスと比べて有意に減少した(対照マウス:  $-70.6 \pm 0.5$  mV, 欠損マウス:  $-62.3 \pm 3.1$  mV,  $P < 0.001$ )(Fig. 6.3D)。AP 摂取欠損マウスで欠損マウスと比べて有意に減少した( $P < 0.001$ ) (Fig. 6.3C)。欠損マウスで約半数の心筋細胞が、不完全な再分極によると思われる脱分極後の早期に自動能を呈する異常細胞が認められ(Fig. 6.3E)、その割合は対照マウスと比べて有意に増大した( $P < 0.001$ , Fig. 6.3F)。AP 摂取欠損マウスで欠損マウスと比べて有意に減少した( $P < 0.001$ , Fig. 6.3F)。

#### 6.3.4 リンゴポリフェノール摂取による心室心筋細胞の膜電流への影響

AP の摂取が欠損マウスの活動電位を改善することが確認されたことから、次に、活動電位変化に関わるホールセル膜電流量を測定し、結果を Fig. 6.4 に示す。細胞の脱分極時に電位依存的に内向きに流れる  $I_{Ca}$  の電流密度を測定したところ、各試験群間の有意な差は認められなかった(Fig. 6.4A, B)。次に、細胞の脱分極時に一過性に外向きに流れる電位依存性カリウム電流  $I_{peak}$ 、および再分極過程で定常的に外向きに流れるカリウム電流である  $I_{ss}$  の各電流密度を測定した。外向き電位依存性カリウム電流の測定は、細胞表面灌流液を  $Na^+$ -free,  $Co^{+}$ -containing の HEPES-Tyrode 溶液として、保持電位 -70 mV から脱分極パルスステップワイズで上昇させた。 $I_{peak}$  の電流密度は各試験群間で有意な差は認められなかった(Fig. 6.4C, D)。 $I_{ss}$  の電流密度は各試験群間で有意な差は認められなかったが(Fig. 6.4E)、欠損マウスおよび AP 摂取欠損マウスで減少傾向が認められた。対照的に、内向き整流性カリウム電流  $I_{K1}$  の電流密度は、測定電位をそれぞれ -50, -60, および -70 mV へ変化させた場合には、Fig. 6.5 に示すように、欠損マウスで対照マウスと比べて有意に減少した(-50 mV:  $P < 0.05$ , Fig. 6.5A, B)。AP 摂取欠損マウスで欠損マウスと比べて有意に増大した(Fig. 6.5B)( $P < 0.05$ )。

#### 6.3.5 リンゴポリフェノール摂取による心室心筋細胞のコネキシン 43 タンパク量への影響

心臓の電気伝導性に関与する Cx43 タンパク量を、ウエスタンブロットおよび免疫染色で確認した。LV 破碎物のウエスタンブロットより、欠損マウスで対照マウスと比べて Cx43 は顕著に減少した

(Fig. 6.6A)。AP 摂取欠損マウスで欠損マウスと比べて、増大する傾向が認められた。LV 切片の Cx43 特異的抗体を用いた免疫染色より、欠損マウスで対照マウスと比べて、顕著に減少した(Fig. 6.6B, C)。AP 摂取欠損マウスで欠損マウスと比べて、Cx43 量は有意に回復した( $P < 0.05$ , Fig. 6.6B, C)。

## 6.4 考察

慢性的な ROS によって引き起こされる心臓電気生理学的異常については、これまでに解析されていなかった。また、AP 摂取の慢性的な ROS による心臓電気生理学的異常に対する影響についても、これまで検討されていなかった。本章では、酸化ストレスによる心臓電気生理学的変化を明らかにしたのち、AP 摂取による影響について検証した。心臓が酸化ストレスに慢性的に曝露されたモデルとして H/M-*Sod2*<sup>-/-</sup>マウスを使用し、その心臓電気生理学的の変化を解析したところ、種々の異常が認められた。ECG では、QRS と QT 間隔の延長が観察された。また、心室にペーシングを与えたときの ERP は延長し、心室の頻回ペーシングにより心室性不整脈の発生頻度が増大した。心室筋細胞では、APD は延長し、静止膜電位の絶対値は減少して浅くなり、異常な自動能を呈した。さらに、内向き整流カリウム電流  $I_{K1}$  が減少し、Cx43 の分子数も減少した。

ECG は、心臓から離れた場所で心臓全体の電気現象を測定する方法であり、心臓組織のうち活動電位の変化速度が大きい心房や心室の電位変化が波形として測定される<sup>(15)</sup>。波形のうち、QRS 波は心室筋の活動電位の脱分極における立ち上がりを示し、T 波は心室筋の再分極を示す<sup>(16)</sup>。また、心臓は電気刺激を加えたときに反応して興奮するが、その刺激周期を短縮していくと、ある周期以下で興奮が生じなくなる。ERP は、その最長の不応期のことを指す<sup>(17)</sup>。本研究では、欠損マウスでは対照マウスと比べて、これらの値がいずれも延長したが、これは欠損マウスでの心室拡張により心室筋細胞の電気伝導性が遅延したことが一因と考えられた。

Whole-cell パッチクランプ法による細胞の電気生理学的評価は、細胞1個の電気活動をとらえることができる<sup>(18)</sup>。この方法で取得される APD は、細胞の活動電位の時間幅を示す。また、静止膜電位は、絶対値が増大し深くなると安定し、逆に減少して浅くなると細胞の膜電位は安定しなくなる<sup>(19)</sup>。静止膜電位の減少は、刺激を受けずに自ら興奮するペースメーカー活動(自動能)頻度の亢進へとつながる<sup>(18)</sup>。そして、静止膜電位の増大による安定化には、 $I_{K1}$  が重要な役割を担っている<sup>(18)</sup>。本研究では、欠損マウスの単離した心室筋細胞で APD が大きく延長し、細胞ごとの値のばらつきも大きくなった。また、静止膜電位は減少し、異常な自動能を呈する細胞数が増大した。さらに、 $I_{K1}$  が減少した。以上より、欠損マウスではイオンチャネルの機能が心筋細胞レベルで

低下し、これにより種々の電気生理学的性質が変化したものと推察された。

コネキシンは、細胞間のギャップジャンクションの機能を有する分子群の総称であり、心筋細胞では細胞間の電気伝導機能を司る分子である<sup>(20,21)</sup>。本研究では、欠損マウスの心室組織で Cx43 が顕著に減少したが、このことが心室における電気伝導機能の低下へつながったと推察された。

不整脈は、「興奮発生の異常」、「興奮伝導の異常」の2つのメカニズムにより発生する<sup>(19)</sup>。本研究では、欠損マウスの不整脈の発生率が大きく増加した。以上の結果および考察より、欠損マウスでは、イオンチャネルの機能低下やコネキシンの減少により、心筋細胞レベルでの興奮発生の異常と、心筋細胞間の興奮伝導の異常が生じることで、不整脈が起こりやすいと考えられた。

欠損マウスにおける上述の心臓電気生理学的異常は、AP 摂取で部分的に改善され、不整脈の発生率は非摂取群と比べて有意に減少した。酸化ストレスとの関連では、 $I_{K1}$  は急性の酸化ストレスにより抑制されることが報告されている<sup>(22-24)</sup>。本研究では、慢性的な ROS によっても  $I_{K1}$  が抑制されることが示された。Cx43 については、急性および慢性の酸化ストレスにより減少し、それは過剰な ROS により Cx43 タンパク質の分解が促進されるためと考察されている<sup>(25)</sup>。第 5 章において、AP の摂取は生体内でも抗酸化作用を有することを明らかにした。以上の結果および考察より、AP の抗酸化作用により、酸化ストレスで機能低下する  $I_{K1}$  や Cx43 の回復につながることで、最終的に不整脈の発生が抑制され、生存率が上昇したと推察された。

食品由来ポリフェノール成分の摂取による心機能改善作用については、ポリフェノールであるレスベラトロール、クルクミン、およびブドウ種子ポリフェノールが報告されている<sup>(26-28)</sup>。これらは圧ストレスによる急性的に ROS を発生させたモデル動物での心不全または不整脈機能について評価しており、老化進行のような慢性的 ROS に対する不整脈等の心臓電気伝導性を改善した報告はこれまでない。すなわち、今回の AP による不整脈改善作用については、食品成分の新たな機能性を見出したことになり意義深い。

## 6.5 要約

本章では、第 5 章における AP による生存率向上について、その作用機序を詳細に理解するために、本マウスにおける AP の心臓における電気生理学的変化、および不整脈発生率に対する影響について検証した。欠損マウスでは心室性電気伝導性の異常による心電図波形の変化が観察され、AP を摂取した欠損マウスでは部分的に改善された。*in vivo* における開胸下での左心室への電極刺激による有効不応期は欠損マウスで延長し、AP を摂取した欠損マウスでは有意な短

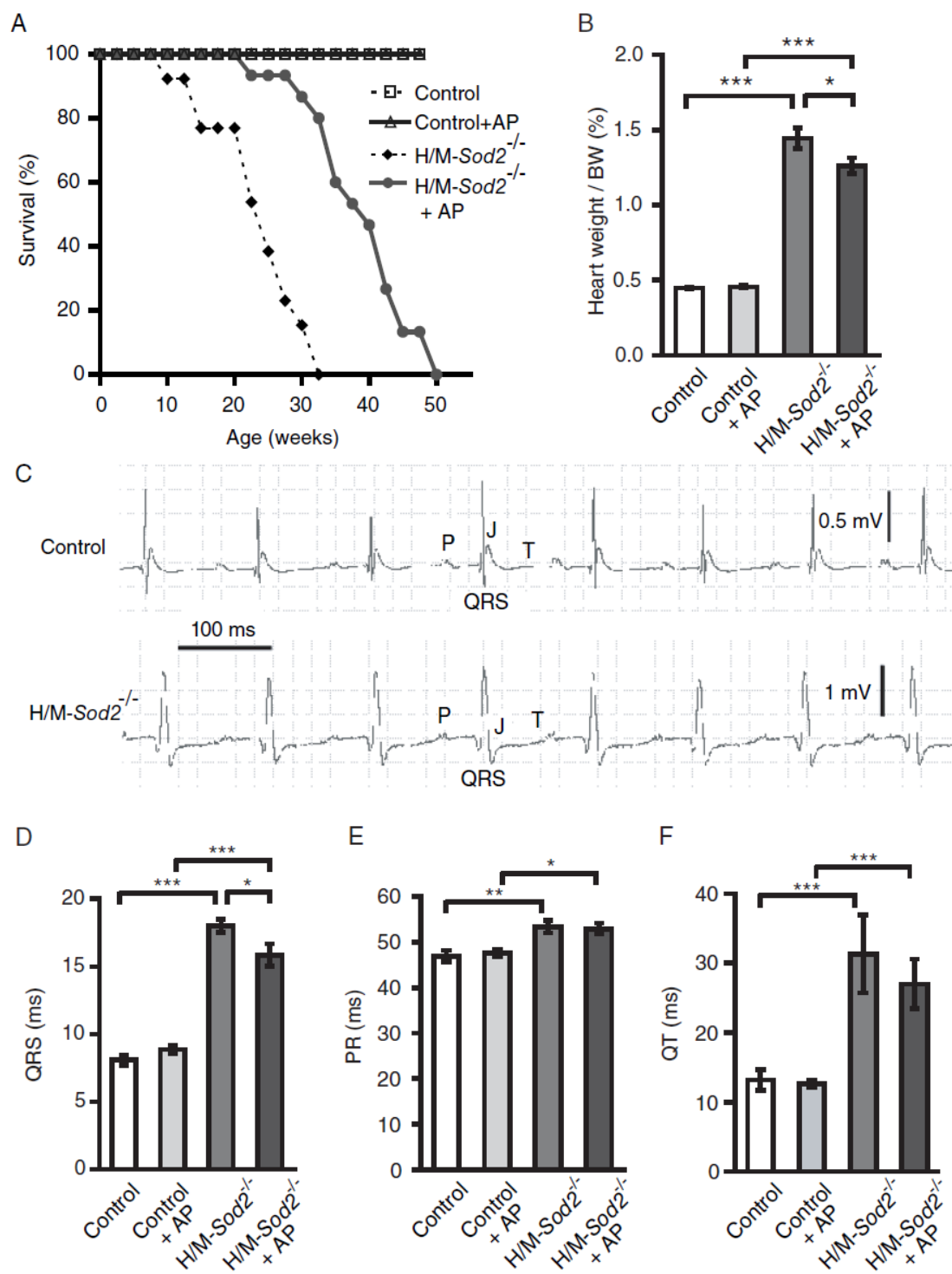
縮が認められた。欠損マウスでは、左心室頻回刺激後に心室性不整脈の一種である心室頻拍または心室細動の発生率が有意に増大したが、AP 摂取欠損マウスではこれらの心室性不整脈の発生率が有意に減少した。一方、単離心筋細胞のパッチクランプ試験より、欠損マウスの左心室筋細胞の活動電位持続時間は有意に延長したが、AP 摂取欠損マウスでは有意に短縮した。また、静止膜電位の絶対値は、欠損マウスで有意に減少したが、AP 摂取欠損マウスで有意に減少した。欠損マウスで約半数の心筋細胞で、異常な自動能を呈する細胞が認められ、その割合は対照マウスと比べて有意に増大したが、AP 摂取欠損マウスで有意に減少した。内向き整流性カリウム電流  $I_{K1}$  は、欠損マウスで対照マウス群と比べて有意に減少し、AP 摂取欠損マウスで有意に増大した。心臓の電気伝導性に関与する左心室 Cx43 タンパク量は、欠損マウスで減少したが、AP 摂取欠損マウスで部分的に回復した。心臓での慢性的な酸化ストレスの曝露によって、心臓で種々の電気生理学的異常が発生し、心室性不整脈の発生率が増大し、 $I_{K1}$  の減少に関連した活動電位変化が発生したが、抗酸化食品である AP の摂取により、電気生理学的異常が部分的に改善されることを明らかにし、その改善作用により生存率が上昇したと推察された。

## 6.6 参考文献

1. Glasser, S.P., Clark, P.I., Applebaum, H.J. Occurrence of frequent complex arrhythmias detected by ambulatory monitoring: findings in an apparently healthy asymptomatic elderly population. *Chest*. **75**, 565-568 (1979)
2. Aronow, W.S., Epstein, S., K.S., S., Koenigsberg, M. Prevalence of arrhythmias detected by ambulatory electrocardiographic monitoring and of abnormal left ventricular ejection fraction in persons older than 62 years in a long-term health care facility. *Am J Cardiol*. **59**, 368-369 (1987)
3. Tresch, D.D., Thakur, R.K. Ventricular arrhythmias in the elderly. *Emerg Med Clin North Am*. **16**, 627-648 (1998)
4. Lucas, D.T., Szewda, L.I. Cardiac reperfusion injury: aging, lipid peroxidation, and mitochondrial dysfunction. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **95**, 510-514 (1998)
5. Lakatta, E.G. Arterial and cardiac aging: Major shareholders in cardiovascular disease enterprises. Part III: Cellular and molecular clues to heart and arterial aging. *Circulation*. **107**, 490-497 (2003)
6. van der Loo, B., Bachschmid, M., Spitzer, V., Brey, L., Ullrich, V., Luscher, T.F. Decreased plasma and tissue levels of vitamin C in a rat model of aging: Implications for antioxidative defense. *Biochem Biophys Res Commun*. **303**, 483-487 (2003)
7. Nojiri, H., Shimizu, T., Funakoshi, M., Yamaguchi, O., Zhou, H., Kawakami, S., Ohta, Y., Sami, M., Tachibana, T., Ishikawa, H., Kurosawa, H., Kahn, R.C., Otsu, K., Shirasawa, T. Oxidative stress causes heart failure with impaired mitochondrial respiration. *J Biol Chem*. **281**, 33789-33801 (2006)

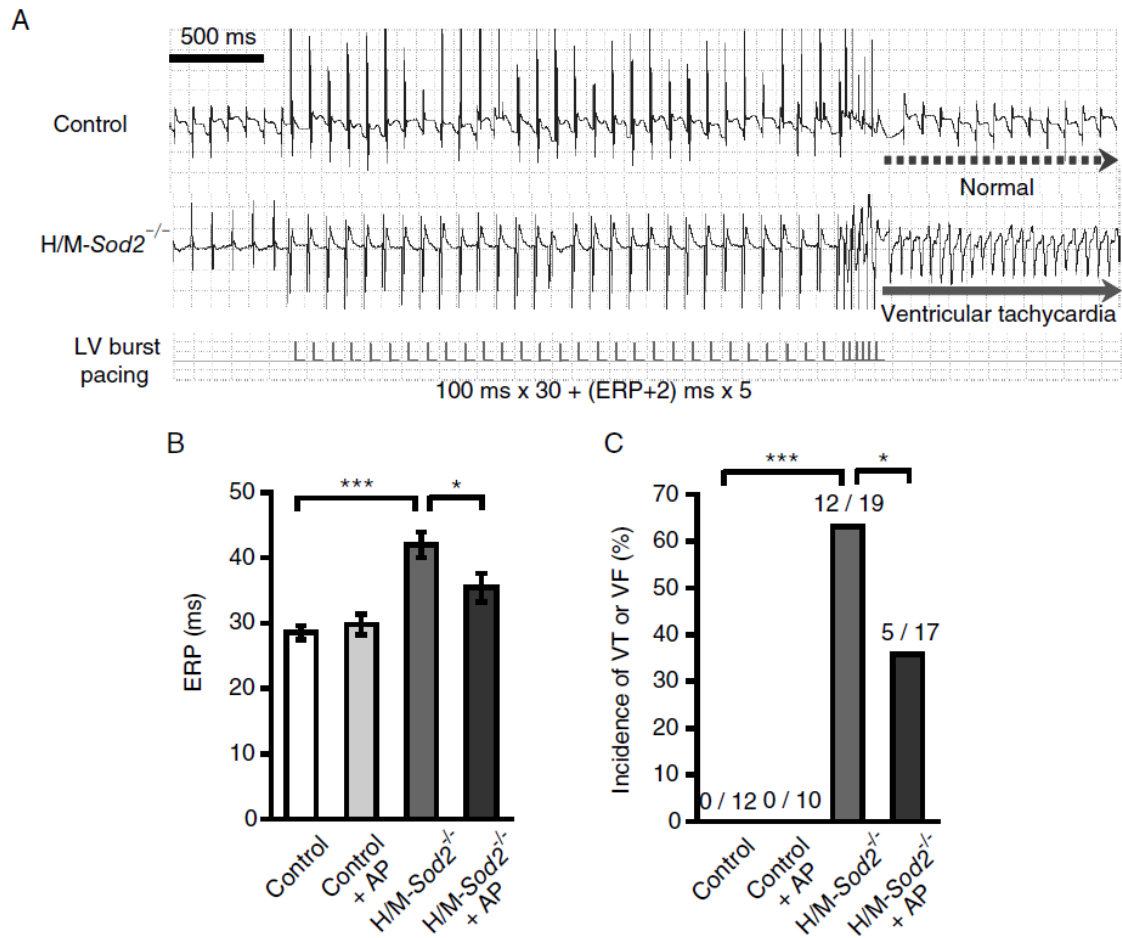
8. Nakaya, H., Tohse, N., Kanno, M. Electrophysiological derangements induced by lipid peroxidation in cardiac tissue. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* **253**, H1089-1097 (1987)
9. Tarr, M.T., Valenzano, D.P. Modification of cardiac action potential by photosensitizer-generated reactive oxygen. *J Mol Cell Cardiol.* **21**, 539-543 (1989)
10. Aiello, E., Jabr, R., Cole, W. Arrhythmia and delayed recovery of cardiac action potential during reperfusion after ischemia. Role of oxygen radical-induced no-reflow phenomenon. *Circ Res.* **77**, 153-162 (1995)
11. Akar, F.G., Aon, M.A., Tomaselli, G.F., O'Rourke, B. The mitochondrial origin of postischemic arrhythmias. *J Clin Invest.* **115**, 3527-3535 (2005)
12. Suzuki, M., Sasaki, N., Miki, T., Sakamoto, N., Ohmoto-Sekine, Y., Tamagawa, M., Seino, S., Marban, E., Nakaya, H. Role of sarcolemmal K<sub>ATP</sub> channels in cardioprotection against ischemia/reperfusion injury in mice. *J Clin Invest.* **109**, 509-516 (2002)
13. Loda, M., Fogt, F., French, F.S., Posner, M., Cukor, B., Aretz, H.T., Alsaigh, N. Androgen receptor immunohistochemistry on paraffin-embedded tissue. *Mod Pathol.* **7**, 388-391 (1994)
14. Ludbrook, J. Multiple comparison procedures updated. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* **25**, 1032-1037 (1998)
15. 基礎と臨床のための動物の心電図・心エコー・血圧・病理学検査. 菅野茂, 中田義礼, 局博一編, アドスリー, 東京. p.p. 6-9 (2003)
16. 基礎と臨床のための動物の心電図・心エコー・血圧・病理学検査. 菅野茂, 中田義礼, 局博一編, アドスリー, 東京. p.p. 22-31 (2003)
17. 新 目でみる循環器病シリーズ 7 不整脈. 小川聡編. メジカルビュー, 東京. p. 131 (2005)
18. 倉智嘉久, 心筋細胞イオンチャネルー心臓のリズムと興奮の分子メカニズム. 文光堂, 東京 p.p. 137-151 (2000)
19. 倉智嘉久, 心筋細胞イオンチャネルー心臓のリズムと興奮の分子メカニズム. 文光堂, 東京 p.p. 207-216 (2000)
20. van Kempen, M.J.A., Fromaget, C., Gros, D., Moorman, A.F.M., Lamers, W.H. Spatial distribution of connexin43, the major cardiac gap junction protein, in the developing and adult rat heart. *Circ Res.* **68**, 1638-1651 (1991)
21. Peters, N.S., Green, C.R., Poole-Wilson, P.A., Severs, N.J. Reduced content of connexin43 gap junctions in ventricular myocardium from hypertrophied and ischemic human hearts. *Circulation.* **88**, 864-875 (1993)
22. Bhatnagar, A. Electrophysiological effects of 4-hydroxynonenal, an aldehydic product of lipid peroxidation, on isolated rat ventricular myocytes. *Circ Res.* **76**, 293-304 (1995)
23. Matsuura, H., Shattock, M.J. Effects of oxidant stress on steady-state background currents in isolated ventricular myocytes. *Am J Physiol.* **261**, H1358-1365 (1991)
24. Nakaya, H., Takeda, Y., Tohse, N., Kanno, M. Mechanism of the membrane depolarization induced by oxidative stress in guinea-pig ventricular cells. *J Mol Cell Cardiol.* **24**, 523-534 (1992)
25. Kawakami, S., Matsuda, A., Sunagawa, T., Noda, Y., Kaneko, T., Tahara, S., Hiraumi, Y., Adachi, S., Matsui, H., Ando, K., Fujita, T., Maruyama, N., Shirasawa, T., Shimizu, T. Antioxidant, EUK-8, prevents murine dilated cardiomyopathy. *Circ J.* **73**, 2125-2134 (2009)
26. Li, H.L., Liu, C., de Couto, G., Ouzounian, M., Sun, M., Wang, A.B., Huang, Y., He, C.W., Shi, Y., Chen, X., Nghiem, M.P., Liu, Y., Chen, M., Dawood, F., Fukuoka, M., Maekawa, Y., Zhang, L., Leask, A., Ghosh, A.K., Kirshenbaum, L.A., Liu, P.P. Curcumin prevents and reverses murine cardiac hypertrophy. *J Clin Invest.* **118**, 879-893 (2008)
27. Yoshida, Y., Shioi, T., Izumi, T. Resveratrol ameliorates experimental autoimmune myocarditis.

- Circ J.* **71**, 397-404 (2007)
28. Al-Makdessi, S., Sweidan, H., Jacob, R. Effect of oligomer procyanidins on reperfusion arrhythmias and lactate dehydrogenase release in the isolated rat heart. *Arzneimittelforschung.* **56**, 317-321 (2006)

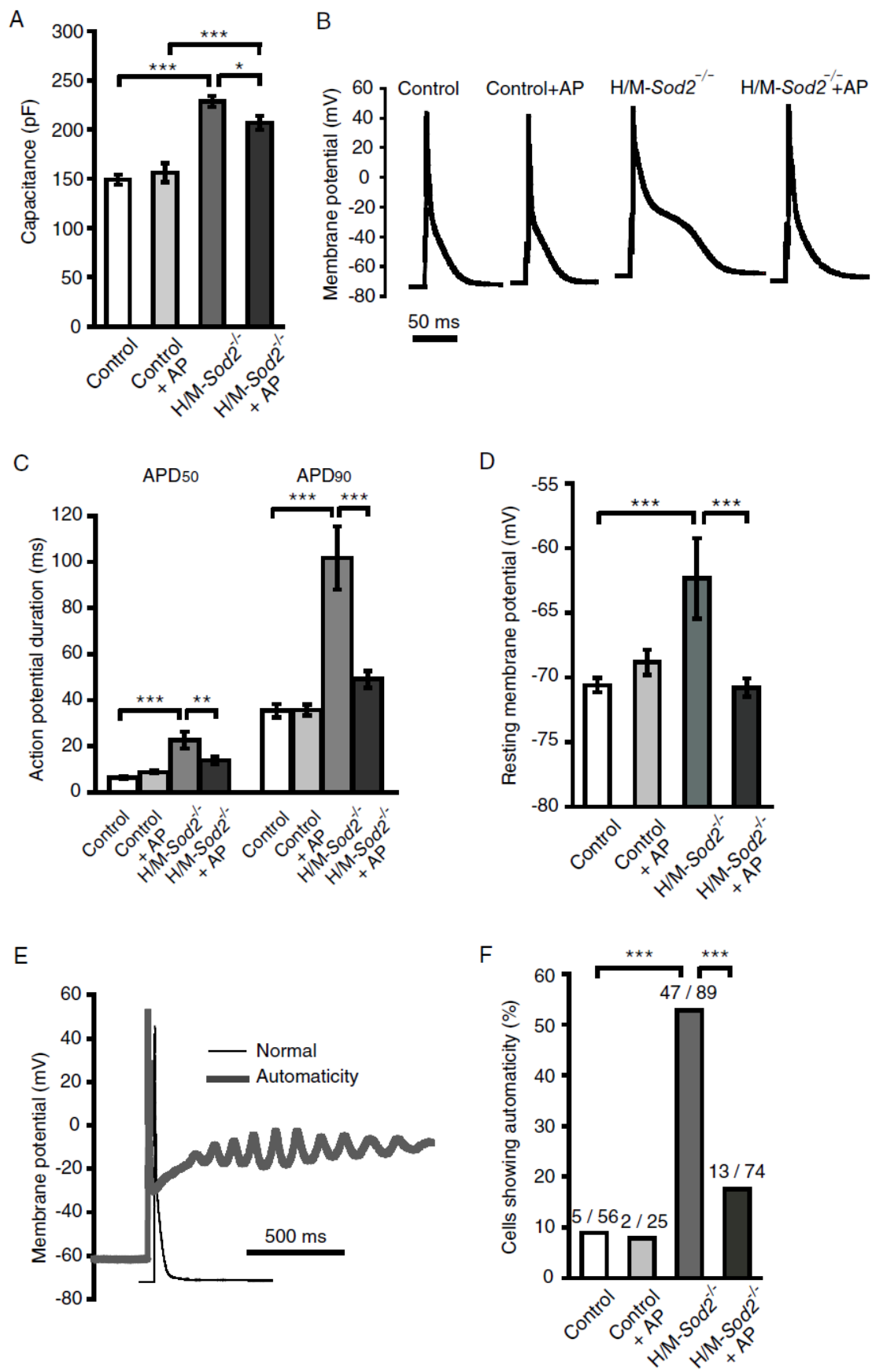




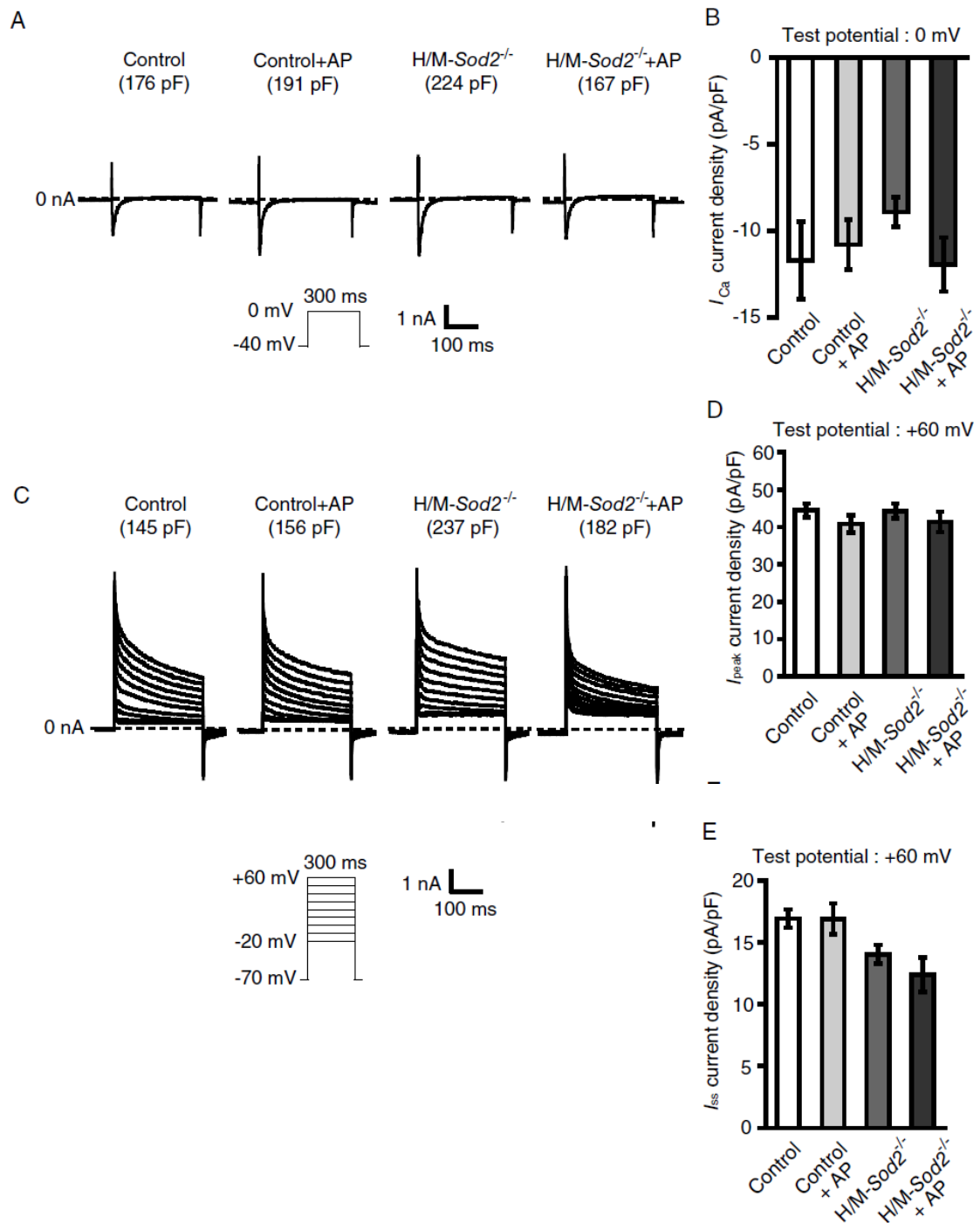
**Fig. 6.1** Effects of chronic apple polyphenols (AP) intake on life span, heart weights, and electrocardiograms (ECG) in control and H/M-*Sod2*<sup>-/-</sup> mice. **A:** Survival curves of 4 experimental groups. Control, *n* = 10, Control+AP, *n* = 10, H/M-*Sod2*<sup>-/-</sup>, *n* = 13, H/M-*Sod2*<sup>-/-</sup>+AP, *n* = 15. **B:** Heart weight normalized by body weight in 4 experimental groups. Control, *n* = 8, Control+AP, *n* = 9, H/M-*Sod2*<sup>-/-</sup>, *n* = 15, H/M-*Sod2*<sup>-/-</sup>+AP, *n* = 15. **C:** Representative records of surface ECG (lead II) in Control and H/M-*Sod2*<sup>-/-</sup> mice. **D:** QRS durations, **E:** PQ intervals, **F:** QT intervals of ECG recorded in 4 experimental groups. (D,E) Control, *n* = 7, Control+AP, *n* = 10, H/M-*Sod2*<sup>-/-</sup>, *n* = 13, H/M-*Sod2*<sup>-/-</sup>+AP, *n* = 12. (F) Control, *n* = 7, Control+AP, *n* = 10, H/M-*Sod2*<sup>-/-</sup>, *n* = 7, H/M-*Sod2*<sup>-/-</sup>+AP, *n* = 7. Values are mean value ± SEM, \*\*\**P* < 0.001, \**P* < 0.05.



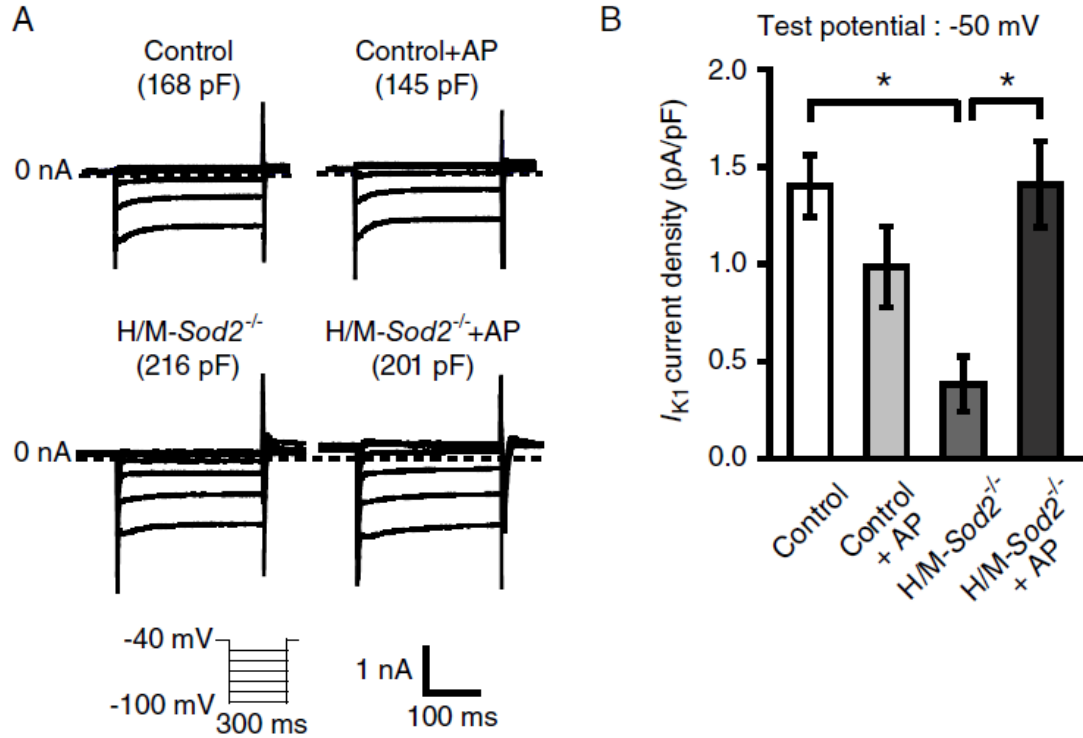
**Fig. 6.2** Effects of chronic AP intake on effective refractory period (ERP) and vulnerability to ventricular tachycardia (VT) and ventricular fibrillation (VF) during burst ventricular pacing in control and H/M-Sod2<sup>-/-</sup> mice. **A:** Representative ECG records during burst ventricular pacing observed in a control mouse (upper panel) and H/M-Sod2<sup>-/-</sup> mouse (lower panel). Note that ventricular tachycardia was induced by burst pacing (30 basic stimuli at a 100 ms interval followed by 5 premature stimuli at an interval of ERP + 2 ms) in the H/M-Sod2<sup>-/-</sup> mouse but not in the control mouse. **B:** Ventricular ERP measured in control and H/M-Sod2<sup>-/-</sup> mice with and without AP treatment. Control,  $n = 7$ , Control+AP,  $n = 10$ , H/M-Sod2<sup>-/-</sup>,  $n = 13$ , H/M-Sod2<sup>-/-</sup>+AP,  $n = 11$ . Values are mean value  $\pm$  SEM, \*\*\* $P < 0.001$ , \* $P < 0.05$ . **C:** Incidence of VT or VF induced by burst pacing in control and H/M-Sod2<sup>-/-</sup> mice with and without AP treatment. \*\*\* $P < 0.001$ , \* $P < 0.05$ . Note that chronic intake of AP significantly lessened the prolongation in ERP and decreased the incidence of VT or VF induction in H/M-Sod2<sup>-/-</sup> mice.



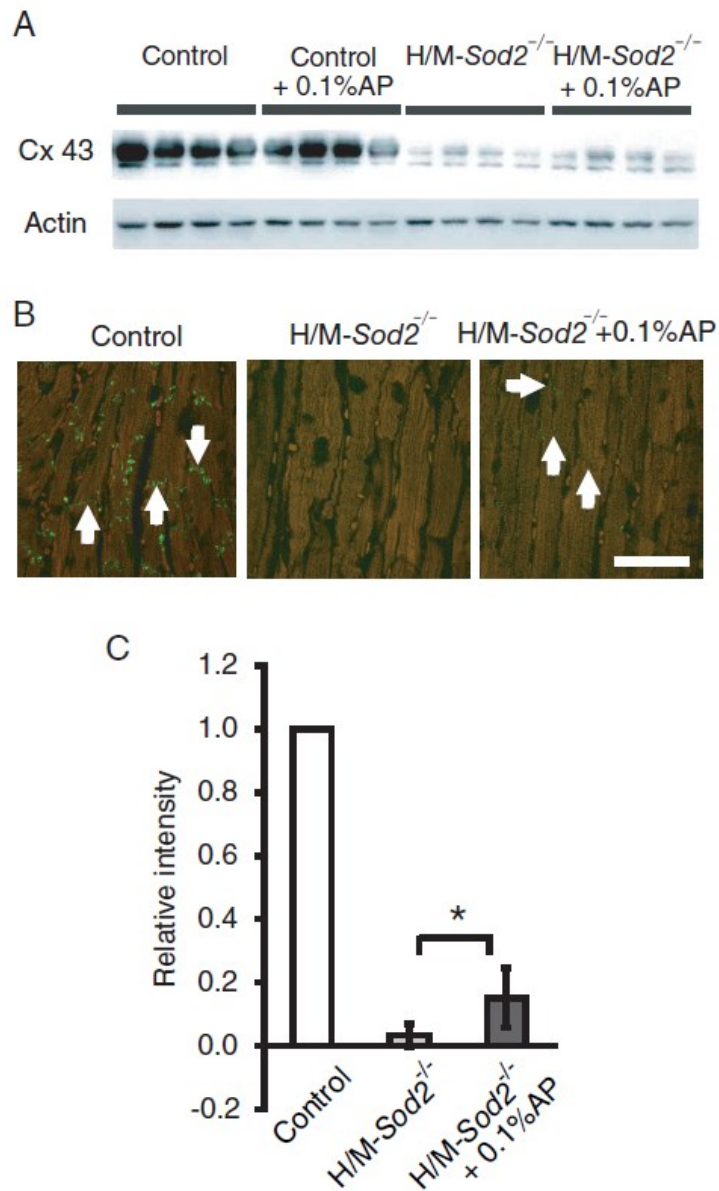
**Fig. 6.3** Action potentials recorded from left ventricular cells of control and H/M-*Sod2*<sup>-/-</sup> mice and influences of chronic AP intake. A: The membrane capacitance of ventricular cells isolated from each group of mice. Values are mean  $\pm$  SEM, Control,  $n = 49$ ; Control+AP,  $n = 33$ ; H/M-*Sod2*<sup>-/-</sup>,  $n = 119$ ; and H/M-*Sod2*<sup>-/-</sup> +AP,  $n = 72$ . B: Representative action potential configurations of the ventricular myocytes in each group. C: Action potential durations at 50% and 90% repolarization levels (APD50 and APD90) in the left ventricular myocytes of each group. Control,  $n = 49$ ; Control+AP,  $n = 32$ ; H/M-*Sod2*<sup>-/-</sup>,  $n = 32$ ; and H/M-*Sod2*<sup>-/-</sup> +AP,  $n = 41$ . Differences between groups, \*\*\* $P < 0.001$ , \*\* $P < 0.01$ . D: Resting membrane potentials in the left ventricular myocytes of each group. Data were obtained from ventricular cells not showing automaticity. Control,  $n = 48$ , Control+AP,  $n = 23$ ; H/M-*Sod2*<sup>-/-</sup>,  $n = 29$ , H/M-*Sod2*<sup>-/-</sup> +AP,  $n = 38$ . Differences between groups, \*\*\* $P < 0.001$ . E: Representative traces of a normal action potential (control group) and action potential showing abnormal automaticity (H/M-*Sod2*<sup>-/-</sup> group). F: The percentage of left ventricular cells showing automaticity. Differences between groups, \*\*\* $P < 0.001$ .



**Fig. 6.4** L-type  $\text{Ca}^{2+}$  and outward  $\text{K}^{+}$  currents recorded from the ventricular cells of control and H/M-*Sod2*<sup>-/-</sup> mice and influences of chronic AP intake. A: Representative current traces of the L-type  $\text{Ca}^{2+}$  current recorded from the left ventricular cells of each group. B: Densities of the L-type  $\text{Ca}^{2+}$  current of the left ventricular cells of each group. Values are mean value  $\pm$  SEM, Control,  $n = 4$ ; Control + AP,  $n = 7$ ; H/M-*Sod2*<sup>-/-</sup>,  $n = 16$ ; and H/M-*Sod2*<sup>-/-</sup> + AP,  $n = 9$ . C: Representative current traces of the outward  $\text{K}^{+}$  current recorded from the left ventricular cells of each group. D: Densities of the peak outward  $\text{K}^{+}$  current ( $I_{\text{peak}}$ ) of the left ventricular cells of each group.  $I_{\text{peak}}$  was measured 2 ms after a 300 ms voltage step to +60 mV. E: Densities of the steady state  $\text{K}^{+}$  current ( $I_{\text{ss}}$ ) of the left ventricular cells of each group.  $I_{\text{ss}}$  was measured at the end of a 300 ms voltage step to +60 mV. Control,  $n = 32$ ; Control + AP,  $n = 31$ ; H/M-*Sod2*<sup>-/-</sup>,  $n = 32$ ; and H/M-*Sod2*<sup>-/-</sup> + AP,  $n = 32$ .



**Fig. 6.5** The inward rectifier K<sup>+</sup> current ( $I_{K1}$ ) recorded from the ventricular cells of control and H/M-Sod2<sup>-/-</sup> mice and influences of chronic AP intake. A: Representative traces of  $I_{K1}$  recorded from the left ventricular cells of each group. B: Densities of  $I_{K1}$  of the left ventricular cells of each group. The density of  $I_{K1}$  was measured at the end of a hyperpolarizing pulse to -50 mV from a holding potential of -40 mV. Note that the density of  $I_{K1}$  in H/M-Sod2<sup>-/-</sup> ventricular cells was significantly smaller than that in control cells and that the reduction in  $I_{K1}$  density in H/M-Sod2<sup>-/-</sup> cells was improved by chronic AP intake. Values are mean value  $\pm$  SEM, Control,  $n = 32$ ; Control + AP,  $n = 31$ ; H/M-Sod2<sup>-/-</sup>,  $n = 32$ ; and H/M-Sod2<sup>-/-</sup> + AP,  $n = 32$ . Differences between groups, \* $P < 0.05$ .



**Fig. 6.6** Connexin 43 (Cx43) protein levels in the hearts of control and H/M-Sod2<sup>-/-</sup> mice. A: Cx43 levels in the hearts of control and H/M-Sod2<sup>-/-</sup> mice with and without AP intake. Western blot analysis of Cx43 protein extracted from hearts was carried out using antibodies against Cx43 and actin,  $n = 4$ . B: Immunostaining with Cx43-specific antibodies of the left ventricular sections of control and H/M-Sod2<sup>-/-</sup> mice. Cx43 protein levels in the H/M-Sod2<sup>-/-</sup> heart relative to the control heart, and chronic 0.1%(w/v) AP intake partially improved Cx43 expression. C: Normalized fluorescence intensity for Cx43 immunostaining of the left ventricular sections obtained from H/M-Sod2<sup>-/-</sup> mice. The fluorescence intensity level was normalized to that determined in the left ventricular sections of control mice. Values are mean value  $\pm$  SEM,  $n = 4$ , \* $P < 0.05$ .



## 第 7 章

### リンゴポリフェノール抗老化機能の総括および 抗老化機能食品開発への展開

#### 7.1 リンゴポリフェノールの抗老化機能の総括

##### 7.1.1 リンゴポリフェノールの抗酸化活性

リンゴポリフェノール(AP)の *in vitro* の抗酸化活性については、第 1 章で述べたように、スーパーオキシドジスムターゼ(SOD)様活性<sup>(1)</sup>、および酸素ラジカル吸収能(ORAC)<sup>(2)</sup>が他の抗酸化物質と比べて高値であった(Fig. 1.3)。AP の重量当りの SOD 様活性は、SOD 模倣化合物である EUK-134 と比べても 1.4 倍あり、AP 中の 2 量体や 3 量体のプロシアニジン(PC) B1、B2 や C1 ではモル当りの活性値が 3.0~4.6 倍とさらに高値であったが、AP 中の単量体画分では EUK-134 と同等であった(Fig. 1.3A)。同様に、AP の重量当りの ORAC 値は、水溶性抗酸化物質であるビタミン C と比べても 4.3 倍あり、PC ではモル当りの ORAC 値が 33~35 倍と非常に高値であった。これはレスベラトロールやチャカテキンの没食子酸エピガロカテキン(EGCG)と比べても高値であった(Fig. 1.3B)。以上より、AP は抗酸化物質の中でもとくに活性が高く、AP の中で PC が抗酸化活性を示す主要な成分であることが確認された。

PCの抗酸化活性が高い理由について、分子構造の点から以下に考察する。PCの構造は、Fig. 7.1 に示すように、カテキンまたはエピカテキン同士の結合様式の違いから、A タイプまたは B タイプに分かれる<sup>(3)</sup>。A タイプは、C 環の 2 位の C 原子と A 環の 7 位の O 原子との結合、かつ C 環の 4 位の C 原子と A 環の 8 位の C 原子との結合を有するものの総称である(Fig. 7.1)。一方、B タイプは、C 環の 4 位の C 原子と A 環の 6 位の C 原子との結合、または C 環の 4 位の C 原子と A 環の 8 位の C 原子との結合を有するものの総称である(Fig. 7.1)。この B タイプの中で、リンゴには 4→8 結合のタイプのみが含まれ<sup>(4)</sup>、例えば B1、B2 および C1 がある(Fig. 7.2)。B1 はエピカテキンおよびカテキンの 4β→8 結合、B2 はエピカテキン 2 分子の 4β→8 結合分子である(Fig. 7.2)。一方、C1 はエピカテキン 3 分子の 4β→8 結合分子である(Fig. 7.2)。

PC の構成単位であるカテキン類のラジカル消去機構については、以下のように報告されている。B 環カテコール基(*ortho*-ジヒドロキシ構造)の 2 つのヒドロキシル基(3'位および 4'位)は 2 段階の水素原子供与反応にてラジカルを捕捉し、セミキノンラジカルを経て *ortho*-ベンゾキノン体に変

換される(Fig. 7.3)<sup>(5)</sup>。また、カテコール基は、隣接する3'位のO原子と4'位のH原子で形成される水素結合が芳香族ラジカルの安定化に関与することで、ラジカル消去反応の進行に寄与することが報告されている<sup>(6)</sup>。さらに、A環のレゾルシノール基(*meta*-ジヒドロキシ構造)の2つのヒドロキシル基(5位および7位)も、段階的にラジカル消去反応に関わる<sup>(5)</sup>。このように、カテキン類は酸化還元電位が低いカテコール基とレゾルシノール基を有し、1分子内に少なくとも2箇所のラジカル反応性の高い部位を有する。このカテキン単位が重合したPCは、反応性の高いカテコール基を分子内に複数有するため、単量体よりも抗酸化活性が高値であると考えられた。また、PCは分子内で、一方のカテキンB環4'位のO原子と、他方のカテキンB環ヒドロキシル基との間に水素結合を形成することで、ラジカル消去反応性の増大に寄与していることも考えられた<sup>(7)</sup>。さらに、Miyataらは、B1およびB2のラジカル酸化により、2位のC原子に結合する水素原子が引抜かれることでC2→O7結合が生じ、それぞれプロシアニジンA1およびA2へ変換されることを示している(Fig. 7.4)<sup>(8)</sup>。このように複数のラジカル消去反応機構を有することも、PCの抗酸化活性が高値となる理由と考えられた。

APの生体内での抗酸化活性については、第5章で述べたように、APを摂取した心筋特異的マンガン-SOD(Mn-SOD)欠損マウスの心臓において、単離した心筋細胞の活動時における活性酸素種(ROS)産生量の低下や、心臓組織の核DNAに含まれる核酸酸化物量の低下が認められた。また、第6章では、ROSにより機能低下や減少が報告されているイオンチャネルやギャップジャンクションタンパク質が、APを摂取した欠損マウスにおいて改善された。以上より、APを食品として摂取したときにも、生体内で抗酸化作用を有することが確認された。

生体内でのAPの抗酸化作用について、以下に考察する。まず、本欠損マウスにおける酸化ストレス機構について述べる。本マウスは、ミトコンドリアマトリクスに局在するMn-SODが心筋特異的に欠損した結果、心筋細胞ミトコンドリアの電子伝達系活性の低下<sup>(9)</sup>、ミトコンドリアの過酸化脂質量の増加<sup>(9)</sup>、第5章において心臓核DNAに含まれる核酸酸化マーカーである8-oxodG量の増加、そして第6章において心筋細胞のイオンチャネルの機能低下および心筋細胞間を連結するギャップジャンクションタンパク質の減少をもたらした。Mn-SODは、ミトコンドリアの電子伝達系で発生するスーパーオキシド( $O_2^{\cdot-}$ )の不均化反応を触媒する抗酸化酵素である。そのため、本マウスのMn-SOD欠損により心筋細胞での $O_2^{\cdot-}$ の生成量が増え<sup>(9)</sup>、ミトコンドリアマトリクス内で電子伝達系のタンパク質に対して傷害を起こしたり、過酸化脂質の増加を引き起こしたと考えられる<sup>(9)</sup>。しかし、 $O_2^{\cdot-}$ は過酸化水素やヒドロキシルラジカルといったROSと比べると、非酵素的な分解速度が速く化学的に不安定である<sup>(10)</sup>。また、化学的反応性は比較的弱い<sup>(10)</sup>ため、生物毒性は低いとされている<sup>(10)</sup>。一方で、 $O_2^{\cdot-}$ は水溶性荷電分子であるため、細胞内の水溶液空間に分布し、細胞膜のアニオン輸送体を介して膜輸送され、ミトコンドリア内膜を通じてミトコンドリア膜間腔や細胞

質、さらには細胞外へと漏出することが考えられる<sup>(10)</sup>。このようにして移動した  $O_2^{\cdot-}$  は、ミトコンドリア内膜や細胞質に存在する Cu/Zn-SOD や細胞外 SOD による不均化反応により、過酸化水素へと変換される。過酸化水素は、両親媒性であるため細胞の水溶液空間と膜脂質層の両方に存在することができ、膜脂質を容易に通過して移動できる<sup>(10)</sup>。また、化学的にきわめて安定で寿命が長く、化学的反応性が強く、生物毒性が高い<sup>(10)</sup>。このようにして細胞内外や細胞膜周辺に蓄積した過酸化水素が、タンパク質、脂質や核酸などの分子の酸化傷害を引き起こすことで、血液中の過酸化脂質や核内の 8-oxodG が増加したり、酸化修飾を受けたタンパク質のタンパク質分解酵素感受性の亢進により<sup>(10)</sup>、イオンチャネルやギャップジャンクションの分解が促進され、機能が低下したと推察された。

つづいて、本欠損マウスにおける生体内抗酸化機構について考察する。不均化反応により、 $O_2^{\cdot-}$  を過酸化水素へ変換する酵素 SOD は、細胞質内に存在する Cu/Zn-SOD、ミトコンドリア内膜の Mn-SOD、細胞外 SOD の3種があり、本マウスでは心筋細胞にて Mn-SOD が欠損している。上述のように、ミトコンドリアで産生した  $O_2^{\cdot-}$  はミトコンドリアから漏出した分子が Mn-SOD 以外の SOD で過酸化水素へ変換されると考えられる。その過酸化水素を消去する抗酸化酵素は、カタラーゼやグルタチオンペルオキシダーゼ(GSH-Px)が存在する。GSH-Px は、過酸化水素を水へ分解するとともに、還元型グルタチオン(GSH)を酸化して GSSH へ変換する。酸化された GSSH は、GSH レダクターゼにより還元、再生される。一方、生体内の抗酸化系では、上述のような酵素だけではなく抗酸化ビタミンのような低分子化合物も重要な役割を担う<sup>(11)</sup>。抗酸化ビタミンとしてはビタミン C やビタミン E が挙げられ、ビタミン C は血漿や細胞水溶液に存在する水溶性ビタミンであり、ビタミン E は細胞膜脂質や血中リポタンパク質に存在する脂溶性ビタミンである<sup>(11)</sup>。これらの化合物は電子供与性が高く、ROS に対して直接ラジカル消去を行うほか、GSH-Px で過酸化水素を分解する際に酸化された GSH の還元ビタミン C が利用され、その際酸化されるビタミン C 酸化体のヒドロキシアスコルビン酸の還元、ビタミン E が利用される<sup>(11)</sup>。このように、ビタミンは生体内抗酸化酵素のはたらきを維持するために重要な役割を担う。一方、酸化ストレスが増加する喫煙者では、非喫煙者に比べて血漿中のビタミン C 濃度が低いことが報告されており<sup>(12)</sup>、酸化ストレス下では摂取したビタミンが ROS の消去や抗酸化系の維持のために消費されて不足してしまうと考えられる。以上より本欠損マウスでの機構を考察すると、心筋細胞での  $O_2^{\cdot-}$  の増大により、過酸化水素をはじめとする ROS が過剰となり、生体内抗酸化酵素が十分機能できていないこと、さらに酵素機能を維持するための抗酸化ビタミンが消費され減少したことが、さらなる酸化ストレスの上昇につながったと推察される。

つづいて、AP の生体内での抗酸化作用について考察する。AP の摂取は本マウスの 8-oxodG を減少させ、イオンチャネルの機能維持やコネキシン量の増加をもたらしたが、この原因が抗酸

化活性の強い AP による直接的な ROS 消去作用に起因する割合は小さいと考えられる。その理由は、AP 成分は単回経口摂取後に血中での存在が確認されているが<sup>(13)</sup>、その量は PC においては数十  $\mu\text{g/mL}$  のレベルであり、さらに細胞膜を透過する量も少ないと推定されるため<sup>(14)</sup>、最終的に細胞内へ吸収される量は非常にわずかと考えられるからである。一方、ヒトでフラボノイドの摂取により血中ビタミン C の低下が抑制されることが報告されている<sup>(15)</sup>。このことは、酸化ストレスにより酸化され消費された抗酸化成分の減少度が、AP の摂取により軽減されることを示している。以上より考察すると、AP の生体内での抗酸化作用は以下のような機構が考えられる。まず、ラジカル消去作用が強力な AP が、血中や細胞内外で直接ラジカルを消去して、生体内の抗酸化系を補助することに寄与した。一方、細胞内の ROS に対しては、細胞内外を自由に出入りして細胞内から細胞外や血中に放出された酸化型のビタミンや GSH を、AP が還元し再生することで、生体内のレドックス状態を還元型にして、再生された抗酸化成分を細胞内に供給することにより細胞内の抗酸化系の維持に寄与し、最終的に ROS の産生を抑制した機構が考えられる。

#### 7.1.2 リンゴポリフェノールの抗老化機能

本論文における「老化」は、酸化ストレスに起因し、器官の機能が低下して種々の疾患を発生し、最終的に生存率低下に至る状態のことである。また、本論文における「抗老化機能」とは、抗酸化作用により器官の機能低下や疾患発生を抑制する作用、およびその結果として生存率の向上をもたらす作用のことである。第 3 章から第 6 章では、種々の評価系を用いて、酸化ストレスに起因する器官の機能低下、罹患、および生存率低下を抑制する「抗老化機能」について評価し明らかにしてきた(Fig. 7.5)。老化にともない進行する神経変性疾患の原因となるアミロイド  $\beta$  (A $\beta$ ) タンパク質に対して、AP は *in vitro* で凝集を抑制し、細胞の毒性から保護することを明らかにした(第 3 章)。線虫への AP の投与により神経変性疾患の原因となるタンパク質凝集を抑制することを明らかにした(第 3 章)。また、野生型動物である線虫への AP の投与により、線虫の生存率を向上させることを明らかにした(第 4 章)。さらに、Mn-SOD 遺伝子欠損により酸化ストレスが増大し拡張型心筋症を発症し、心室性不整脈の発生頻度が上昇したモデルマウスへの AP の投与は、心筋変性を抑制し、不整脈発生率を低減し、心臓機能を保護することにより、マウスの生存率を向上させることを明らかにした(第 5、6 章)。また、心臓における ROS の産生を抑制し、酸化ストレスマーカーを低減することを明らかにした(第 5 章)。以上より、AP の摂取が種々の老化モデルに対して老化の進行を抑制するはたらきを有することを明らかにした。

本論文では、AP の有する直接的あるいは間接的な抗酸化作用が、種々の抗老化機能をもた

らすと推察された。生体内では酸化ストレスがA $\beta$ タンパク質凝集を促進するため、マウスを用いてAPの生体内抗酸化作用を明示できたことは、APの摂取がA $\beta$ タンパク質が関与する老化疾患のさらなる抑制につながる可能性が考えられた。また、線虫を用いて生存率向上作用に寿命遺伝子が関与することを明示できたことは、APがヒトにおいても寿命遺伝子制御下にある抗酸化酵素の発現上昇を促進することにより生存率向上へ関与する可能性が考えられた。酸化ストレスは動脈硬化や糖尿病など生活習慣病疾患の発症へ結びつくことが考えられており<sup>(16)</sup>、APの摂取が老化の進行に対してだけでなく、生活習慣病の抑制にも有用となる可能性を示すことができた。

AP抗老化機能の活性成分について総括する。本研究で明らかとなった抗老化機能は、大きく3つの作用に属する。1つは、老化モデルマウス試験での知見から、生体内での抗酸化作用が挙げられる。2つめは、A $\beta$ タンパク質凝集抑制試験での知見から、老化の原因となるタンパク質に対して相互作用することにより原因となる現象を抑制する作用が挙げられる。3つめは、線虫試験での知見から、寿命遺伝子シグナルに対して影響を与えることで老化を抑制する作用が挙げられる。このうち抗酸化作用とタンパク質相互作用については、前項および第3章で述べたように、APの有する構造、すなわち隣接するカテキン単位内のカテコール構造の寄与度が大いと考えられる。APとタンパク質との相互作用については、APの既知の機能、例えばリパーゼの阻害作用による脂質吸収抑制機能においても、PCの構造特異的なリパーゼとの相互作用性について報告されている<sup>(17)</sup>。本研究では、PCがAPの活性主成分であるかの検証は、不十分であるが、3つの作用のうちタンパク凝集抑制作用および寿命遺伝子シグナルを介する老化抑制作用については、第3章および第4章においてPCが活性本体であることが確認された。一方、抗酸化酵素欠損マウスにおける抗酸化作用については、PC単体を投与した検証を行っていないが、前項(7.1.1)で述べたようにAPの作用が抗酸化物質の還元作用に起因するものであれば、*in vitro*での抗酸化作用が強力なPCが活性主成分である可能性が高いと考えられる。本論文ではPCを半分以上占める未精製APの摂取で抗老化機能を有し、未精製APを抗老化機能食品へ応用していくことが可能であることを明らかにした。

第4章では、APが線虫でサーチュインホモログであるSIR2依存的に生存率を向上することを示した。ヒトサーチュインのSIRT1は、心臓虚血に対する保護効果において重要な役割を有する<sup>(18)</sup>。APは炎症性大腸炎を含む酸化ストレス性炎症に対して抑制効果を有し<sup>(19)</sup>、その作用には細胞の抗酸化活性を誘導する転写因子Nrf2の活性化が関与する<sup>(19)</sup>。これらの知見から、APの生体内での抗酸化活性は、ラジカル消去による直接的な作用だけでなく、サーチュイン活性の増強や、細胞防御システムの増強による間接的な作用の可能性も考えられる。

APの生理機能性については、最近の数報の論文でとくに血管内皮機能の改善作用について報告されている<sup>(20-22)</sup>。Catonらは、リンゴPCが血管内皮機能を改善することを示した<sup>(20)</sup>。また、PC

は血管内皮細胞の動脈硬化性疾患進展の原因となるレクチン様酸化 LDL 受容体(LOX-1)の阻害作用を有することが報告された<sup>(21)</sup>。また、3 量体 C1 が、大動脈内皮細胞の NO 産生を促進して機能を改善することが報告された<sup>(22)</sup>。抗老化作用との関連性が明らかにされていくはずである。

AP の生体利用性(bioavailability)については、議論の余地がある。Shoji らは、ラットを用いてリンゴ PC の摂取後、2 量体から 5 量体までが血漿中に検出されることを示した<sup>(13)</sup>。また、ヒトに関する検証では、いずれも数十  $\mu\text{g/L}$ -血漿のオーダーであり、摂取量に比べて極めて少ない<sup>(23)</sup>。Lambert らは、カテキン類をはじめとするポリフェノールの生理的濃度は、*in vitro* 試験で効果を有する濃度と比べて低いことから、生体内では摂取したポリフェノールの分解物や代謝物が活性に影響するとの可能性を指摘している<sup>(24)</sup>。また、Yang らは PC の bioavailability の低さを指摘し、消化管での PC 分解物(主に単量体)が生理作用を有することを指摘している<sup>(25)</sup>。さらに、Yamashita らは 4 量体 PC の摂取がマウスの消化管ホルモンの GLP-1 と膵臓のインスリンの分泌を促進することを示し、吸収される前の PC が消化管内でホルモン分泌のアゴニストとして作用することが考察された<sup>(26)</sup>。以上を総合し、生体内に吸収された PC が強力な抗酸化活性を示すと考えられる。一方、抗老化機能食品への利用に当っては、消化管内や肝臓等で分解、代謝された PC 代謝化合物による生理作用や、消化管内で PC が加齢制御に影響を与えるホルモン分泌の作動薬として作用する可能性を考慮する必要がある。

## 7.2 抗老化機能食品の開発戦略

AP を利用した抗老化機能食品の開発に当り、AP の調製方法、AP の安定化や機能性保持のための処方、食品の成型方法に関する戦略が必要である。AP を利用した抗老化機能食品のコンセプトは、前項より生体内での抗酸化作用が重要であり、それを高めることが重要である。そのため、PC を含むこと、生体内での抗酸化作用を効果的に発現できることが重要である。

まず、AP の調製方法について述べる。AP はリンゴ果実を原料として製造するが、果実のうち幼果はポリフェノール濃度として成熟果の約 10 倍量を含み<sup>(27)</sup>、PC も多く含まれている。一方、幼果はポリフェノールの精製を妨げる糖類が低濃度であるため<sup>(27)</sup>、幼果を製品に利用することは効率的な製造には重要である。以上より、AP の原料として幼果を使用することには大きな利点があると考えられた。

つぎに、AP の安定化や機能性向上のための処方について述べる。第 1 章で述べたように、ポリフェノールをはじめとする抗酸化成分は、自身が酸化されることで生体内のビタミンをはじめとする抗酸化物質を再生する<sup>(28)</sup>。PC と抗酸化ビタミンの生体内相互作用については、PC の添加が

内因性のアスコルビン酸および  $\alpha$ -トコフェロールとのレドックス相互作用により、ROS 消去によるビタミン C の欠乏を抑制し、ビタミン E 酸化体を再生することが報告されている<sup>(29)</sup>。また、Chen らは、フラボノイド類ポリフェノールをビタミン C やビタミン E と組み合わせて摂取することで、相乗的に低密度リポタンパク質(LDL)の酸化が抑制されることを報告している<sup>(30)</sup>。さらに、ビタミンの同時摂取は、フラボノイドの吸収性を高めることが知られている<sup>(31)</sup>。以上より、抗酸化物質のビタミン C やビタミン E を AP とともに製品に利用する処方、AP の安定性を高め、機能性を相乗的に向上させるために大きな利点があると考えられた。ビタミン C およびビタミン E を利用した食品は、食品衛生法の規定に基づく表示に関する内閣府令において、一日摂取目安量の規格基準に用量が適合することを条件に「栄養機能食品」表示が可能であり、「抗酸化作用により健康維持を助ける栄養素」との機能表示が認められている<sup>(32)</sup>。一日の摂取目安量の規格基準値は、ビタミン C が 24~1000 mg、ビタミン E が 2.4~150 mg<sup>(32)</sup>とされていることから、この範囲内での配合が適当と考えられた。

最後に、食品の成型方法について述べる。食品形態は、手軽に継続摂取できるものとしてサプリメント錠剤が考えられた。錠剤化に際しては、油状物質のビタミン E の固形化が課題となるが、ビタミン E とポリフェノールの錠剤化に関して担体へ吸着させ固形化する方法<sup>(33)</sup>や造粒方法<sup>(34)</sup>等の技術が確立されている。また、油状成分と AP を顆粒化、錠剤化する方法<sup>(35)</sup>の技術も確立されている。商品化に際してはこれらの技術の活用が考えられた。

### 7.3 抗老化機能食品の商品化

AP を利用した抗老化機能食品の商品化に当たり、つぎのような開発コンセプトを採用した。商品形態はサプリメント錠剤とし、1 日摂取量としてリンゴポリフェノール 200 mg、ビタミン E 100 mg、ビタミン C 30 mg、トコリエノール 3 mg を有効成分として配合する食品とした。本商品は、抗酸化ポリフェノールの PC を高濃度含む幼果から抽出した AP を原料とすることを訴求して、商品名を「若摘みりんごポリフェノール」とした。また、抗酸化作用により健康維持を助けることを訴求することとした。

商品化に当たり、本論文で得られた知見を活用した内容を以下に述べる。まず、幼果を利用した未精製の AP を商品へ利用することとした。AP の抗酸化活性は PC が活性本体であることから、機能性の点では PC 含量をより高めるような素材調製が望ましい。工業的に PC の含量を高める製造方法としては、吸着樹脂を利用したクロマトグラフィー分離により PC と単量体成分を精製する文献<sup>(36)</sup>等の方法が挙げられる。しかし、この方法では AP のみを製造する方法と比べて精製工程が

増えることから製造コストが増大する。前項(7.1)で述べたように、未精製の AP でも抗老化機能が十分期待されたため、製造コストを勘案して商品開発においては原料を未精製の AP とし、AP 含有を謳うこととした。

つぎに、AP の配合量を決定した。第 5 章や第 6 章における試験では、AP を 0.1% (w/v)含む飲料水でマウスに摂取させた。これは 1 日当たり約 150~200 mg/kg-体重と測定され、ヒトに換算すると 1 日当たり約 150~200 mg に相当すると算出された<sup>(37)</sup>。0.1%という濃度は、リンゴ成熟果汁のポリフェノール濃度と同等レベルである<sup>(38)</sup>。また、200 mg という用量はリンゴ成熟果で約 1 個に含まれるポリフェノール量に相当する。以上より、安全性にも問題のないレベルであることが明らかであった。

最後に、商品の訴求点を抗酸化作用と決定した。本論文での検討結果から、AP の抗酸化活性が老化抑制機能へ関与することが明らかとなったため、抗酸化活性が商品の訴求点となりうると判断された。

また、前項(7.2)で述べたように、抗酸化ビタミン群が AP の抗酸化活性を相乗的に高めることが期待されたため、ビタミンの配合処方を決定した。本商品は、ヒトにおいても酸化ストレスを低減することが確認された<sup>(39)</sup>。有効成分である AP、ビタミン E、ビタミン C、トコリエノールを配合しない錠剤をプラセボ剤として用いた二重盲検並行群間比較試験において、血液中の活性酸素種由来代謝物測定値(Diacron reactive oxygen metabolites, d-ROMs)<sup>(40)</sup>がもともと高値である被験者で、12 週間摂取により d-ROMs が摂取前と比べて減少し、またプラセボ摂取群と比べても減少した。d-ROMs は、生体内の蓄積した過酸化物を反映する酸化ストレスマーカーと考えられている<sup>(40)</sup>。ポリフェノールと抗酸化ビタミンの相乗効果により生体内の慢性的な酸化ストレスが軽減した可能性が考えられる。APを配合した抗酸化食品を継続的に摂取することにより、老化進行の抑制が期待されることが示された。

## 7.4 結言

本章では、AP の抗老化機能の検証結果について総括および考察し、抗老化機能食品開発への展開について述べた。前章までの検証結果から、AP の有する抗酸化活性が、生存率を向上させる一因であると推察された。また、本研究から得られた知見を踏まえて、AP を使用した抗老化機能食品の開発に応用した。原料には抗酸化活性を有する PC の含量が多い幼果を使用し、未精製の AP を使用した。また、機能検証における試験用量から、AP の配合量を決定した。さらに、抗酸化機能を重要な訴求点とし、商品の抗酸化活性をさらに高めるような抗酸化ビタミンを配合



する処方とした。本商品は、実際にヒトにおける抗酸化作用が確認された。AP を配合した抗酸化食品を継続的に摂取することにより、老化進行の抑制が期待されることを明示した。

## 7.5 参考文献

1. Peskin, A.V., Winterbourn, C.C. A microtiter plate assay for superoxide dismutase using a water-soluble tetrazolium salt (WST-1). *Clin Chim Acta*. **293**, 157-166 (2000)
2. Ishimoto, H., Tai, A., Yoshimura, M., Amakura, Y., Yoshida, T., Hatano, T., Ito, H. Antioxidative properties of functional polyphenols and their metabolites assessed by an ORAC assay. *Biosci Biotechnol Biochem*. **76**, 395-399 (2012)
3. Cheyner, V. Polyphenols in foods are more complex than often thought. *Am J Clin Nutr*. **81**, 223S-229S (2005)
4. Shibusawa, Y., Yanagida, A., Ito, A., Ichihashi, K., Shindo, H., Ito, Y. High-speed counter-current chromatography of apple procyanidins. *J Chromatogr A*. **886**, 65-73 (2000)
5. Janeiro, P., Oliveira-Brett, A.M. Catechin electrochemical oxidation mechanisms. *Anal Chim Acta*. **518**, 109-115 (2004)
6. Bors, W., Heller, W., Michel, C., Saran, M. Flavonoids as antioxidants: determination of radical-scavenging efficiencies. *Methods Enzymol*. **186**, 343-355 (1990)
7. Guo, Q., Zhao, B., Packer, L. Electron spin resonance study of free radicals formed from a procyanidin-rich pine (*Pinus maritima*) bark extract, pycnogenol. *Free Radic Biol Med*. **27**, 1308-1312 (1999)
8. Kondo, K., Kurihara, M., Fukuhara, K., Tanaka, T., Suzuki, T., Miyata, N., Toyoda, M. Conversion of procyanidin B-type (catechin dimer) to A-type: evidence for abstraction of C-2 hydrogen in catechin during radical oxidation. *Tetrahedron Lett*. **41**, 485-488 (2000)
9. Nojiri, H., Shimizu, T., Funakoshi, M., Yamaguchi, O., Zhou, H., Kawakami, S., Ohta, Y., Sami, M., Tachibana, T., Ishikawa, H., Kurosawa, H., Kahn, R.C., Otsu, K., Shirasawa, T. Oxidative stress causes heart failure with impaired mitochondrial respiration. *J Biol Chem*. **281**, 33789-33801 (2006)
10. 活性酸素と病態－疾患モデルからベッドサイドへ，井上正康編，学会出版センター，東京，p.p.15-36 (1992)
11. ビタミンの新栄養学，柴田克己，福渡努編集，講談社サイエンティフィク，東京，p.p.112-114 (2012)
12. 厚生労働省「統合医療」に係る情報発信等推進事業，ビタミン C 海外のサイト 医療関係者の方へ「統合医療」情報発信サイト。  
<http://www.ejim.ncgg.go.jp/pro/overseas/c03/16.html>
13. Shoji, T., Masumoto, S., Moriichi, N., Akiyama, H., Kanda, T., Ohtake, Y., Goda, Y. Apple procyanidin oligomers absorption in rats after oral administration: analysis of procyanidins in plasma using the porter method and high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *J Agric Food Chem*. **54**, 884-892 (2006)
14. Vaidyanathan, J.B., Walle, T. Cellular uptake and efflux of the tea flavonoid (-)epicatechin-3-gallate in the human intestinal cell line Caco-2. *J Pharmacol Exp Ther*. **307**, 745-752 (2003)

15. Dubick, M.A., Omaye, S.T. Grape wine and tea polyphenols in the modulation of atherosclerosis and heart disease. *Handbook of Nutraceuticals and Functional Foods*, Second Edition. CRC Press. Boca Raton, FL. p.p.112-115 (2007)
16. 野口範子, 酸化ストレスと疾患. *医学のあゆみ*, **254**, 347-352 (2015)
17. Sugiyama, H., Akazome, Y., Shoji, T., Yamaguchi, A., Yasue, M., Kanda, T., Ohtake, Y. Oligomeric procyanidins in apple polyphenol are main active components for inhibition of pancreatic lipase and triglyceride absorption. *J Agric Food Chem*, **55**, 4604-4609 (2007)
18. Shinmura, K., Tamaki, K., Bolli, R. Impact of 6-mo caloric restriction on myocardial ischemic tolerance: possible involvement of nitric oxide-dependent increase in nuclear Sirt1. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. **295**, H2348-H2355 (2008)
19. Denis, M.C., Furtos, A., Dudonné, S., Montoudis, A., Garofalo, C., Desjardins, Y., Delvin, E., Levy, E. Apple peel polyphenols and their beneficial actions on oxidative stress and inflammation. *PLoS One*. **8**, e53725 (2013)
20. Caton, P.W., Pothecary, M.R., Lees, D.M., Khan, N.Q., Wood, E.G., Shoji, T., Kanda, T., Rull, G., Corder, R. Regulation of vascular endothelial function by procyanidin-rich foods and beverages. *J Agric Food Chem*. **58**, 4008-4013 (2010)
21. Nishizuka, T., Fujita, Y., Sato, Y., Nakano, A., Kakino, A., Ohshima, S. Procyanidins are potent inhibitors of LOX-1: a new player in the French Paradox. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci*. **87**, 104-113 (2011)
22. Byun, E.B., Ishikawa, T., Suyama, A., Kono, M., Nakashima, S., Kanda, T., Miyamoto, T., Matsui, T. A procyanidin trimer, C1, promotes NO production in rat aortic endothelial cells via both hyperpolarization and PI3K/Akt pathways. *Eur J Pharmacol*. **692**, 52-60 (2012)
23. Williamson, G., Manach, C. Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. II. Review of 93 intervention studies. *Am J Clin Nutr*. **81**, 243S-255S (2005)
24. Lambert, J.D., Hong, J., Yang, G.Y., Liao, J., Yang, C.S. Inhibition of carcinogenesis by polyphenols: evidence from laboratory investigations. *Am J Clin Nutr*. **81**, 284S-291S (2005)
25. Yang, C.S., Sang, S., Lambert, J.D., Lee, M.J. Bioavailability issues in studying the health effects of plant polyphenolic compounds. *Mol Nutr Food Res*. **52**, S139-S151 (2008)
26. Yamashita, Y., Okabe, M., Natsume, M., Ashida, H. Cinnamtannin A2, a tetrameric procyanidin, increases GLP-1 and insulin secretion in mice. *Biosci Biotechnol Biochem*. **77**, 888-891 (2013)
27. 特許 3521155 号
28. Packer, L. Vitamin E cycle and benefits to health, Active oxygens, lipid peroxides, and antioxidants, Yagi, K. (Ed.). Japan Sci. Soc. Press, Tokyo, Japan/CRC Press, Boca Raton, FL, p.p. 247-255 (1993)
29. Iglesias, J., Pazos, M., Torres, J.L., Medina, I. Antioxidant mechanism of grape procyanidins in muscle tissues: redox interactions with endogenous ascorbic acid and  $\alpha$ -tocopherol. *Food Chem*. **134**, 1767-1774 (2012)
30. Chen, C.Y., Milbury, P.E., Lapsley, K., Blumberg, J.B. Flavonoids from almond skins are bioavailable and act synergistically with vitamins C and E to enhance hamster and human LDL resistance to oxidation. *J Nutr*. **135**, 1366-1373 (2005)
31. Peters, C.M., Green, R.J., Janle, E.M., Ferruzzi, M.G. Formulation with ascorbic acid and sucrose modulates catechin bioavailability from green tea. *Food Res Int*. **43**, 95-102 (2010)
32. 消費者庁ホームページ:健康や栄養に関する表示の制度について.  
<http://www.caa.go.jp/foods/index4.html>
33. 特開昭 63-243034 号
34. 国際公開 WO 2007/097333 号

- 35. 特許 4970546 号
- 36. 特許 4856298 号
- 37. 安原一, 小林真一. 非臨床(前臨床)試験での薬効評価, 続医薬品の開発 第8巻 薬効評価. 中島光好編集, 廣川書店, 東京, p.p.7-18 (1997)
- 38. Kruger, M.J., Davies, N., Myburgh, K.H., Lecour, S. Proanthocyanidins, anthocyanins and cardiovascular diseases. *Food Res Int.* **59**, 41–52 (2014)
- 39. 澤田陽子, 杉本篤, 佐見学, 白澤卓二. りんご未熟果実ポリフェノールを含む抗酸化物質配合剤によるヒト酸化ストレス低減効果. 日本未病システム学会雑誌. **21**, 21-35 (2015)
- 40. Iamele, L., Fiocchi, R., Vernocchi, A. Evaluation of an automated spectrophotometric assay for reactive oxygen metabolites in serum. *Clin Chem Lab Med.* **40**, 673-676 (2002)

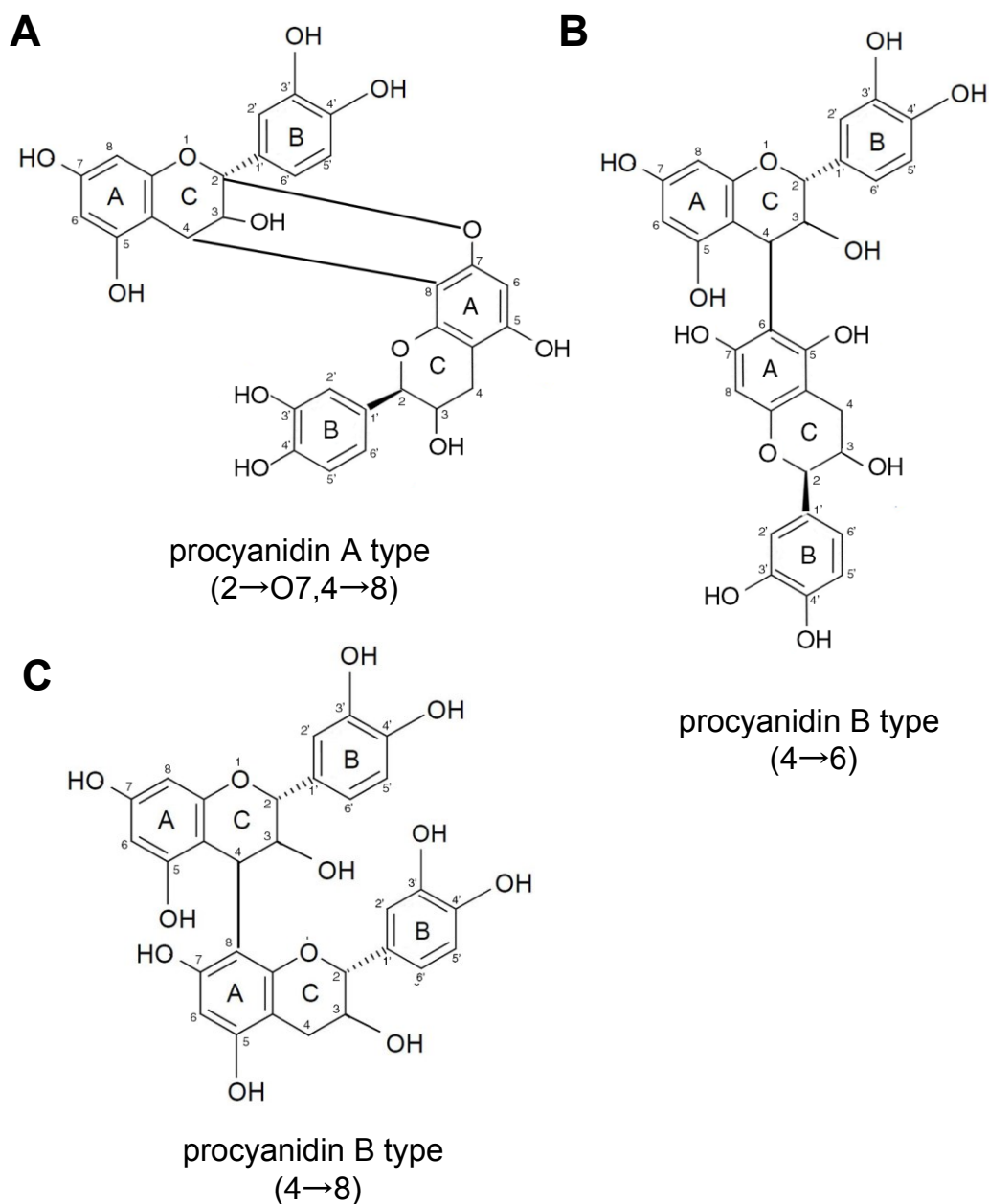


Fig. 7.1. Procyanidins A- and B type structures (catechin dimers). (A) Procyanidin A type has the bond both between C at the 2 position in one C ring and O at the 7 position in other A ring, and between C at the 4 position in one C ring and C at the 8 position in other A ring. Procyanidin B type has (B) the bond between C at the 4 position in one C ring and C at the 6 position in other A ring, or (C) the bond between C at the 4 position in one C ring and C at the 8 position in other A ring. Procyanidins with 4-8 bond are contained in apple.

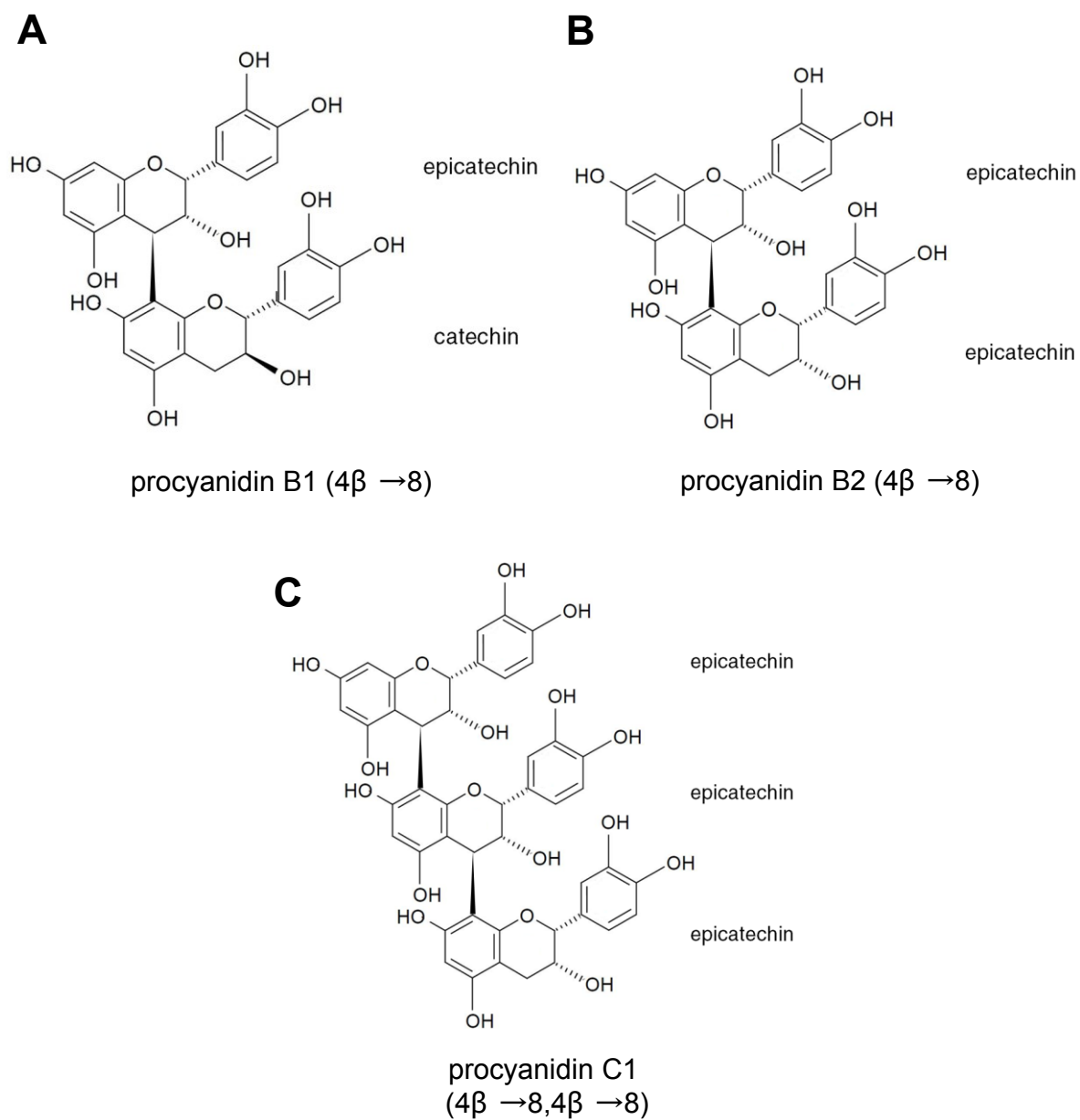


Fig. 7.2. Procyanidins B type, B1, B2, and C1 structures. (A) Procyanidin B1, (B) B2, (C) C1.

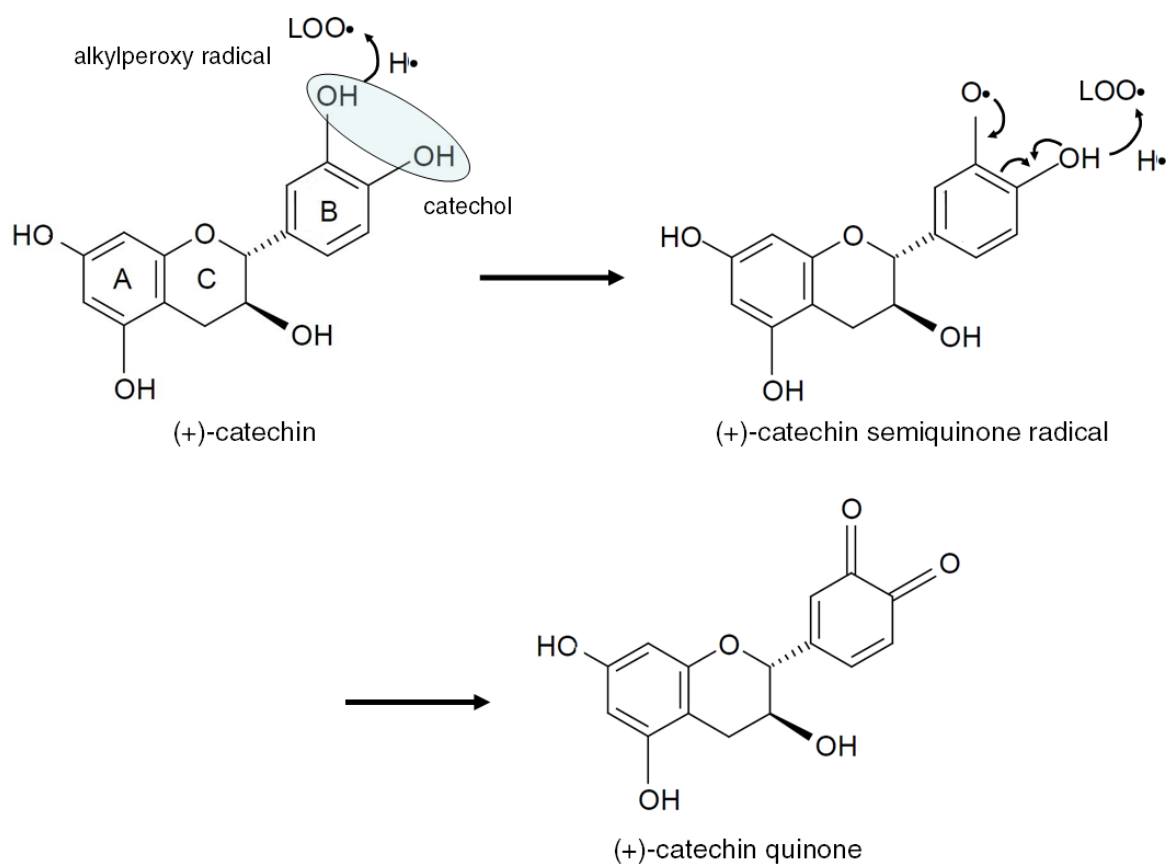


Fig. 7.3. Radical scavenging reaction of catechin involved in catechol group. The data were reproduced from reference<sup>(5)</sup>.

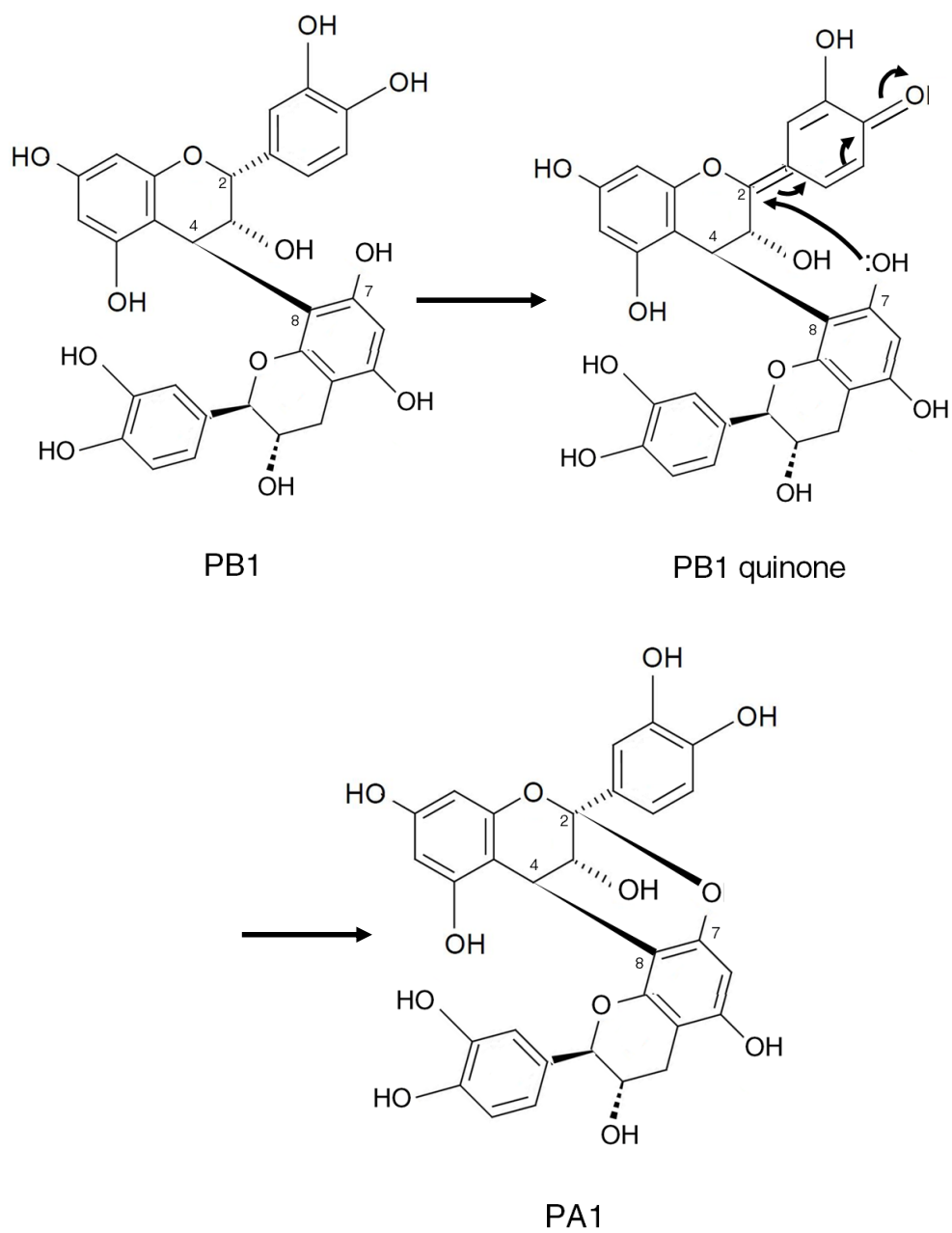


Fig. 7.4. Radical oxidation reaction with conversion of procyanidin B1 into A1. The data were reproduced from reference<sup>(8)</sup>.

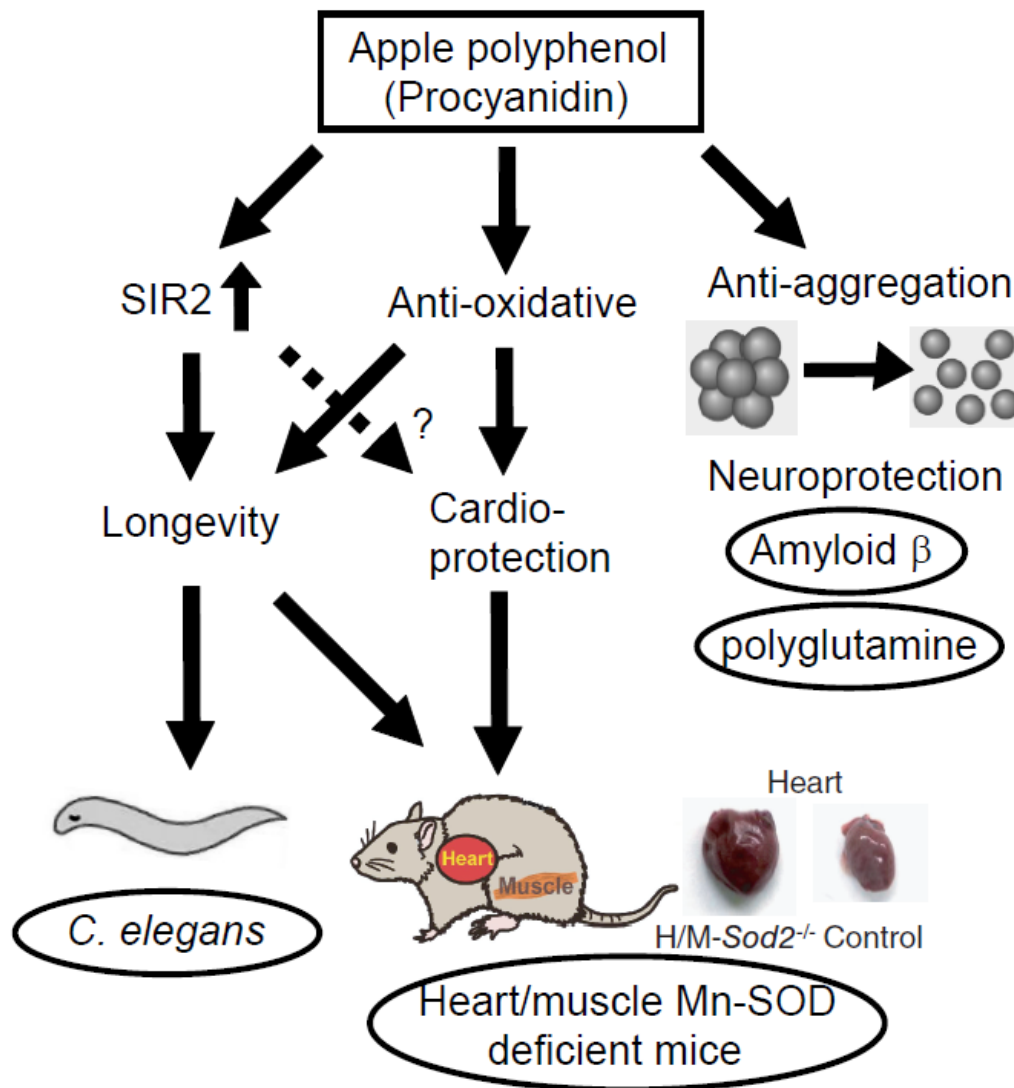


Fig. 7.5. The APs and apple PCs have several anti-aging effects on organisms *in vitro* and *in vivo*.



## 第 8 章

### 結論

#### 8.1 各章の総括

本論文では、リンゴポリフェノール(AP)を活用した抗老化機能食品開発への展開を目的として、*in vitro* に加え細胞および老化モデル生物を用いた *in vivo* での試験を実施し、生体内での AP の抗酸化作用や抗老化作用の有無と機能性食品への展開の可能性を検証した。

第 1 章では、ポリフェノールの諸性質や生体への影響、および食品による酸化ストレスと老化の制御に関して、他者の研究成果をまとめた総論を記述した。さらに、AP の抗老化機能食品への応用に関する意義を述べた。

第 2 章では、AP の摂取が高コレステロール食摂取にともなう血中コレステロール値の上昇を改善し、生活習慣病に対して予防的にはたらくことと、その機能が肝臓で低密度リポタンパク質 (LDL) 受容体やステロイド代謝遺伝子の発現上昇を促進することによる可能性を示した。

第 3 章では、老化にともない進行するアルツハイマー病の原因となるアミロイド  $\beta$  タンパク質 ( $A\beta$ ) の凝集体形成を AP が *in vitro* で抑制し、培養細胞に対しても  $A\beta$  による細胞毒性を用量依存的に抑制することを示した。

第 4 章では、AP の投与が野生型線虫の生存率を上昇させ、長寿遺伝子とされる  $NAD^+$  依存ヒストン脱アセチル化酵素遺伝子 *sir2* 欠損型線虫の生存率を上昇させなかったことから、AP は Sir2 を介して生存率を向上させる可能性を示した。

第 5 章では、AP が抗酸化機能を活性化する可能性が考えられたため、マンガン-スーパーオキシドジスムターゼ (Mn-SOD) を心筋でのみ欠損させたマウスにおける生存率および酸化ストレスに対する AP の影響について検証したところ、AP の摂取が生存率を向上させ、心筋組織の線維化度や心臓 DNA 中の酸化傷害マーカーである 8-オキソ-2'-デオキシグアノシン量を低減させた。また、AP の摂取は単離した心筋細胞において活性酸素種 (ROS) 産生量を低減させた。以上より、AP の摂取が心臓の酸化ストレスを軽減化することで心臓の傷害度が減少させ、マウスの生存率を向上させる可能性を示した。

第 6 章では、心筋特異的 Mn-SOD 欠損マウスにおける AP の不整脈に対する影響について検証したところ、AP の摂取が心室頻回刺激誘発による心室性不整脈の発生率上昇を抑制し、単離した左心室心筋細胞の電気生理学的異常を改善したことから、AP はその抗酸化活性により、酸

化ストレスにより誘発される心筋細胞の電気生理学的異常を改善し、不整脈を抑制する可能性を示した。これらの検証から、AP の有する抗酸化活性が、生存率を向上させる一因であると推察された。

第 7 章では、第 2 章から第 6 章までの成果を基盤として、抗老化機能食品開発への展開に関する取り組みについて記述した。AP を使用した抗老化機能食品への展開に関しては、原料に抗酸化活性の高いプロシアニジン含量が多いリンゴ幼果を使用していることが、消費者訴求となりうる知見を得た。また、機能検証における試験用量から、AP の配合量に関する知見を得た。さらに、抗酸化が重要な訴求点となることから、商品の抗酸化活性をさらに高めるような抗酸化ビタミン群、例えば水溶性のビタミン C や脂溶性のビタミン E を配合する処方が考えられた。以上の知見から、AP を利用して老化抑制作用を有する食品の開発へ応用しうることを示し、商品開発に至ったことを述べた。

## 8.2 今後の展望

リンゴは、世界中で栽培され、最も生産および消費量の多い果物類の一つである。種子や果皮に多く含まれるブドウポリフェノールと比べて、AP は可食部の果汁に多く含まれていることから、容易に日常的に摂取することができる<sup>(1,2)</sup>。一方で、リンゴ果実には糖分が多いこと等から、リンゴ丸ごとの摂取は制限が必要な人もいる。また、AP は体脂肪低減作用等の有益な生理作用を有するため、AP のみを配合した機能性商品を摂取することで効果が期待できる。そのため、機能性成分である AP を、効率よく手軽に摂取できることが必要である。本論文では、手軽に摂取可能な食品成分である AP が抗老化作用を示すことを明示した(第2章から第6章)。また、AP を配合した食品が健康維持や QOL(quality of life)向上の役割を担う食品となりうること、とくに抗老化機能食品への展開が期待できることを記述した(第7章)。さらに、本論文の成果をもとに、AP の商品開発が進められ、その一例として「若摘みりんごポリフェノール」等が製品化された<sup>(3,4)</sup>。今後も、本論文の研究成果を基盤として AP を活用した商品開発が展開されるであろうし、本論文の内容は AP を活用した商品開発を通じて健康社会の実現に大きく貢献するものと考えている。

## 8.3 参考文献

1. Lu, Y., Yeap Foo, L. Antioxidant and radical scavenging activities of polyphenols from apple pomace. *Food Chem.* **68**, 81-85 (2000)
2. Oszmianski, J., Wojdylo, A., Kolniak, J. Effect of enzymatic mash treatment and storage on phenolic composition, antioxidant activity, and turbidity of cloudy apple juice. *J Agric Food Chem.* **57**, 7078-7085 (2009)
3. アサヒフードアンドヘルスケア 会社情報 『アサヒ 若摘みりんごポリフェノール』新発売.  
<http://www.asahi-fh.com/company/newsrelease/2013/130125.html>
4. アサヒの健康生活オンラインショップ アサヒ 若摘みりんごポリフェノール.  
<https://www.asahi-kenko.com/apple/>

## 研究業績

種 類 別	題名、 発表・発行掲載誌名、 発表・発行年月、 連名者(申請者含む)
a. 論文 ○(報文)	1. Cardiac electrophysiological alterations in heart/muscle-specific manganese-superoxide dismutase-deficient mice: Prevention by a dietary antioxidant polyphenol. <i>BioMed Res. Int.</i> 2014, Article ID 704291, 12 pages (2014). <u>Sunagawa T</u> , Shimizu T, Matsumoto A, Maruyama H, Tagashira M, Kanda T, Shirasawa T, Nakaya H.
○(報文)	2. Hypocholesterolemic effect of dietary apple polyphenol is associated with alterations in hepatic gene expression related to cholesterol metabolism in rats. <i>Int. J. Life Sci. Med. Res.</i> 3, 50-58 (2013). <u>Sunagawa T</u> , Ohta Y, Sami M, Kanda T, Osada K.
○(報文)	3. Apple polyphenols regulate mitochondrial superoxide generation and extend survival in a mouse model of dilated cardiomyopathy. <i>Int. J. Life Sci. Med. Res.</i> 2, 46-51 (2012). <u>Sunagawa T</u> , Watanabe K, Ozawa Y, Nakashima S, Kanda T, Tagashira M, Sami M, Kaneko T, Tahara S, Nakaya H, Shirasawa T, Shimizu T.
○(報文)	4. Apple procyanidins suppress amyloid beta-protein aggregation. <i>Biochem. Res. Int.</i> 2011, Article ID 784698, 8 pages (2011). Toda T, <u>Sunagawa T</u> , Kanda T, Tagashira M, Shirasawa T, Shimizu T.
○(報文)	5. Procyanidins from apples ( <i>Malus pumila</i> Mill.) extend the lifespan of <i>Caenorhabditis elegans</i> . <i>Planta Med.</i> 77, 122-127 (2011). <u>Sunagawa T</u> , Shimizu T, Kanda T, Tagashira M, Sami M, Shirasawa T.
(報文)	6. Antioxidant, EUK-8, prevents murine dilated cardiomyopathy. <i>Circ. J.</i> 73, 2125-2134 (2009). Kawakami S, Matsuda A, <u>Sunagawa T</u> , Noda Y, Kaneko T, Tahara S, Hiraumi Y, Adachi S, Matsui H, Ando K, Fujita T, Maruyama N, Shirasawa T, Shimizu T.
b. 総説	1. Antioxidants regulate mitochondrial superoxide generation and extend survival in a mouse model of dilated cardiomyopathy. <i>Molecules</i> 17, 1383-1393 (2012). Koyama H, Nojiri H, Kawakami S, <u>Sunagawa T</u> , Shirasawa T, Shimizu T.
c. 著書	1. Anti-aging effects of apple procyanidins. <i>Proanthocyanidins: Food Sources, Antioxidant Properties and Health Benefits</i> . Nova Science Publishers, Hauppauge, NY, USA, pp.139-159 (2015). <u>Sunagawa T</u> , Masuda I, Shimizu T.

種 類 別	題名、 発表・発行掲載誌名、 発表・発行年月、 連名者(申請者含む)
d. 講演	<p>1. ランチョンセミナー りんごポリフェノールの寿命延長研究のご紹介. 日本農芸化学会 2013 年度大会(仙台), 講演番号 LS13, 2013 年 3 月. 白澤卓二, <u>砂川忠広</u>.</p> <p>2. りんごポリフェノールは心筋特異的 Mn-SOD 欠損マウスにおいて活性酸素の生成を抑制する. 日本農芸化学会 2013 年度大会(仙台), 講演番号 2A16p08, 2013 年 3 月. 佐見学, <u>砂川忠広</u>, 田頭素行, 神田智正, 中谷晴昭, 白澤卓二, 清水孝彦.</p> <p>3. リンゴ果汁由来プロシアニジンによるタンパク質異常凝集の抑制および神経細胞毒性の軽減作用. 第 34 回日本分子生物学会年会(横浜), 講演番号 1T12PI-7, 2011 年 12 月. 戸田年彦, <u>砂川忠広</u>, 神田智正, 田頭素行, 白澤卓二, 清水孝彦.</p> <p>4. 心筋特異的 Mn-SOD 欠損マウスにおける電気生理学的異常とリンゴポリフェノール慢性投与の影響. 第 27 回日本心電学会学術集会(大分), 講演番号 15, 講演要旨集: 心電図 30(suppl 4), p. 165 (2010), 2010 年 3 月. 中谷晴昭, 松本明郎, <u>砂川忠広</u>, 田頭素行, 佐見学, 清水孝彦, 白澤卓二.</p> <p>5. Dietary apple polyphenol improves survival of heart/muscle specific manganese-superoxide dismutase-deficient mice. 19th International Congress of Nutrition (Bangkok, Thailand), Poster No. P95-09, Abstract p. 463. Oct 2009. <u>Sunagawa T</u>, Shimizu T, Kanda T, Tagashira M, Shirasawa T.</p> <p>6. JSoFF ミニシンポ ポリフェノールの生理機能と新しい話題. ifia/HFE JAPAN 2009 (東京), セミナープログラム E, 2009 年 5 月. <u>砂川忠広</u>.</p> <p>7. りんごポリフェノールの抗老化効果. 第 8 回日本抗加齢医学会総会(東京), 講演番号 P-032, 講演要旨集 p. 154, 2008 年 6 月. <u>砂川忠広</u>, 清水孝彦, 近藤祐香, 佐見学, 田頭素行, 神田智正, 白澤卓二.</p> <p>8. りんごポリフェノールは心筋 Mn-SOD 欠損マウスの寿命を延長する. 日本農芸化学会 2008 年度大会(名古屋), 講演番号 2B06p08, 講演要旨集 p. 146, 2008 年 3 月. <u>砂川忠広</u>, 清水孝彦, 近藤祐香, 佐見学, 田頭素行, 神田智正, 白澤卓二.</p> <p>9. Anti-aging effects of apple polyphenols. 3rd International Conference on Polyphenols and Health (Kyoto, Japan), Poster No. P229, Abstract p. 271. Nov. 2007. <u>Sunagawa T</u>, Kanda T, Sami M, Ohtake Y, Shimizu T, Shirasawa T.</p> <p>他 6 件(合計 15 件)</p>

種 類 別	題名、 発表・発行掲載誌名、 発表・発行年月、 連名者(申請者含む)
e. その他	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. (特許):特開 2007-197374</li> <li>2. (特許):特開 2004-73134, 特許 3892365 号</li> <li>3. (特許):特開 2002-275072, 特許 4958339 号</li> <li>4. (受賞):Young Investigator Award, 3rd International Conference on Polyphenols and Health (Kyoto, Japan), Nov. 2007.</li> <li>5. (商品):健康補助食品「アサヒ若摘みりんごポリフェノール」2013 年 2 月 4 日発売</li> <li>6. (寄稿):生活習慣病とサプリメント第 15 回 りんごポリフェノールの抗老化機能. <i>脳心血管抗加齢研究会機関誌 Anti-aging Science</i>, 7, 108-114 (2015). <u>砂川忠広</u>.</li> <li>7. (寄稿):りんごポリフェノールによる老化抑制効果. <i>果汁協会報</i>. 608, 1-8 (2009). <u>砂川忠広</u>, 田頭素行, 佐見学, 神田智正, 清水孝彦, 白澤卓二.</li> <li>8. (記事):「リンゴポリフェノール アサヒ、老化抑制効果」. 日経産業新聞 2013 年 4 月 19 日号</li> <li>9. (記事):「特集 利用拡大するりんご素材 リンゴポリフェノールに抗老化・寿命延長作用」. 健康食品新聞 2008 年 5 月 7 日号</li> <li>10. (論文):A submerged culture using whole barley is associated with the up-regulation of amylases and post-translational pathway closer to a solid culture of <i>Aspergillus kawachii</i>. <i>J. Agr. Sci. Technol.</i> A4, 13-26 (2014) <u>Sunagawa T</u>, Masuda S, Shoji H.</li> <li>11. (講演):シンポジウム「産業界での物質生産に向けた応用展開」焼酎製造における液体培養麹の開発. 第 14 回糸状菌分子生物学コンファレンス(仙台), 講演番号 S-1, 講演要旨集 p. 19-20, 2014 年 11 月. <u>砂川忠広</u>.</li> <li>12. (講演):A submerged culture using whole barley is associated with the up-regulation of amylases and post-translational pathway closer to a solid culture of <i>Aspergillus kawachii</i>. 10th International Mycological Congress (Bangkok, Thailand), Abstract ID ABS0163, p. 891, Aug 2014. <u>Sunagawa T</u>, Masuda S, Shoji H, Aizawa M.</li> <li>13. (講演):玄大麦を用いた液体麹における白麹菌 <i>Aspergillus kawachii</i> の遺伝子発現解析. 日本農芸化学会 2013 年度大会(仙台), 講演番号 4B22a06, 2013 年 3 月. <u>砂川忠広</u>, 舩田晋, 内橋康充, 結城敏文, 安原貴臣, 杉本利和, 小路博志, 福田和郎.</li> <li>14. (講演):難分解性糖質を用いた液体培養における麹菌 <math>\alpha</math>-アミラーゼ高生産機構. 第 58 回日本生物工学会大会(大阪), 講演番号 2D10-4, 講演要旨集 p. 69, 2006 年 9 月. <u>砂川忠広</u>, 杉本利和, 小路博志, 横田豊一, 大竹康之.</li> </ol> <p>他講演 1 件(合計 15 件)</p>

## 謝辞

本論文を執筆するにあたり、多大なるご指導、ご高配を賜りました早稲田大学理工学術院先進理工学部応用化学科教授・桐村光太郎先生、早稲田大学理工学術院先進理工学部応用化学科教授・木野邦器先生、早稲田大学理工学術院先進理工学部応用化学科教授・西出宏之先生に深く感謝の意を表し、厚く御礼申し上げます。先生方の貴重なご助言により、視野を広くもち研究を遂行することの重要性を認識し、本論文を執筆することができました。とくに、筆者が早稲田大学理工学部及び理工学研究科在学中より親切丁寧なご指導とご鞭撻を賜りました桐村光太郎先生にはあらためて感謝の意を表します。

本論文は、筆者が財団法人東京都老人総合研究所(現・地方独立行政法人東京都高齢者医療センター研究所)・老化ゲノムバイオマーカー研究チーム、ならびに国立大学法人千葉大学大学院・医学研究院・薬理学講座において駐在して実施した研究成果を総括したものです。本研究に関して、貴重なご指導とご助言を賜りました、現順天堂大学大学院医学研究院加齢制御医学講座教授・白澤卓二先生に厚く御礼申し上げます。本研究に関して、貴重なご指導とご助言を賜りました、現千葉大学大学院医学研究院加齢制御研究チーム准教授・清水孝彦先生に深甚なる謝意を表します。本研究に関して、貴重なご指導とご助言を賜りました、現千葉大学大学院副学長・中谷晴昭先生に謹んで謝意を表します。

本論文の第2章の遂行にあたり、貴重なご指導とご助言を賜りました、弘前大学農学部准教授、現明治大学農学部准教授・長田恭一先生に深厚なる謝意を表します。本論文の第3、4、5、6章の遂行にあたっては、東京都老人総合研究所老化ゲノムバイオマーカー研究チームの方々に多くのご助言とご協力を賜りました。深く感謝申し上げます。研究全般に関するご助言をいただいた高橋真由美博士、野尻英俊博士、川上哲博士に謹んで謝意を表します。研究作業全般をサポートいただいた森泉栄子氏、野田義彦氏、小澤裕介氏、近藤祐香氏に謹んで謝意を表します。第3章の遂行にあたり、研究作業全般をサポートいただいた戸田年彦氏、村上一馬博士、村田央氏に謹んで謝意を表します。第5章の遂行にあたり、貴重なご助言と研究作業をサポートいただいた、金子孝夫博士、田原正一氏に謹んで謝意を表します。研究作業全般をサポートいただいた船越政史博士、周赫英博士、伊藤美由紀氏、渡辺憲史氏、渋谷修一氏、宮島浩志氏、澤田正義氏に謹んで謝意を表します。第6章の遂行にあたり、貴重なご指導とご助言を賜りました、千葉大学大学院医学研究院薬理学講座准教授・松本明郎先生に深厚なる謝意を表します。研究作業全般をサポートいただいた、千葉大学大学院医学研究院薬理学講座玉川正次氏、丸山広央氏、霊園良恵氏に謹んで謝意を表します。

本論文は、筆者が在籍するアサヒビール株式会社(現アサヒグループホールディングス株式会

社)において実施した研究成果を総括したものです。本研究に関して、貴重なご指導とご助言をいただいた、アサヒグループホールディングス株式会社 R&D センター長・大竹康之博士に深厚なる謝意を表します。本研究に関して、貴重なご指導とご助言をいただいた、アサヒグループホールディングス株式会社 R&D 副センター長・イノベーション研究所長・神田智正博士に深く感謝申し上げます。本研究に関して、貴重なご指導とご助言をいただいた、アサヒグループホールディングス株式会社研究開発部門ゼネラルマネジャー・佐見学博士に深く感謝申し上げます。本研究に関して、貴重なご指導とご助言をいただいた、アサヒグループホールディングス株式会社研究開発部門マネジャー・田頭素行博士に深く感謝申し上げます。本研究に関して、貴重なご指導とご助言をいただいた、アサヒグループ食品株式会社品質保証本部副本部長・城田昌之博士に深厚なる謝意を表します。本研究に関して、貴重なご指導とご助言をいただいた、アサヒグループホールディングス株式会社知財部門 前ゼネラルマネジャー・横田豊一博士に深く感謝申し上げます。本研究に関して、貴重なご指導とご助言をいただいた、アサヒグループホールディングス株式会社イノベーション研究所 前所長・福田和郎博士に深く感謝申し上げます。本研究に関して、貴重なご指導とご助言をいただいた、アサヒグループホールディングス株式会社 R&D 推進部技術情報室長・結城敏文博士に深く感謝申し上げます。本研究に関して、貴重なご指導とご助言をいただいた、アサヒビール株式会社酒類開発研究所 部長・小路博志博士に深く感謝申し上げます。本研究に関して、貴重なご指導とご助言をいただき、研究作業全般をサポートいただいた、独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構果樹研究所主任研究員・庄司俊彦博士に深厚なる謝意を表します。本研究に関して、貴重なご指導とご助言をいただき、研究作業全般をサポートいただいた、ニッカウキスキー株式会社・太田豊氏、アサヒグループホールディングス株式会社・中島翔平氏に深く感謝申し上げます。

最後に、学位取得に関し、心の支えになり、研究生活をサポートしてくれた家族に、心より感謝いたします。

2016 年 2 月

砂川 忠広