

論文要旨

「緑茶カテキン類の血管内皮機能調節作用 及び LDL 酸化抑制作用に関する研究」

人間文化創成科学研究科ライフサイエンス専攻 鈴木規恵

【研究の背景】

平成 26 年の人口動態統計によると日本人の死因別死亡率の上位に心疾患、脳血管疾患などの動脈硬化性疾患が位置している。冠動脈性疾患は先進諸国のみならず発展途上国を含めた全世界で死因の上位を占めており、動脈硬化症の予防、治療対策の確立は全世界的に必須の課題である。これまで、多くの疫学研究によって心疾患や冠動脈疾患とポリフェノール的一种であるフラボノイド摂取との負の相関が明らかになっており、ポリフェノール摂取による動脈硬化予防効果には高い関心が集まっている。ポリフェノールの中でも緑茶はカテキン類を豊富に含み、日本人の主要なポリフェノール摂取源である。本研究では、動脈硬化発症、進展の中で重要な役割を果たす血管内皮機能と low-density lipoprotein (LDL) 酸化に対して緑茶に含まれるカテキン類が及ぼす影響について検討することを目的とした。

1. カテキン類が血管内皮細胞に及ぼす影響

ヒト臍帯静脈細胞 (HUVEC) に 4 種類のカテキン (EGCG; Epigallocatechin gallate、ECG; Epicatechin gallate、EGC; Epigallocatechin、EC; Epicatechin) 5 μ M を作用させ、血管内皮機能の調節に重要な役割をはたしている nitric oxide (NO) の合成酵素である endothelial nitric oxide synthase (eNOS) シグナル関連因子のリン酸化への影響について Western blotting を用いてタンパク質発現量を測定した結果、control に比べて EGCG、ECG、EGC、EC は eNOS、v-akt murine thymoma viral oncogene (Akt)、adenosine monophosphateactivated protein kinase (AMPK) のリン酸化を顕著に増加させた。また、カテ

キン類が血管内皮細胞における遺伝子発現に及ぼす影響について DNA マイクロアレイを用いて網羅的解析を行った。結果、カテキン添加によって発現が変動した遺伝子は、EGCG で 780 個（増加 282、減少 498）、ECG で 1109 個（増加 284、減少 825）、ECG で 682 個（増加 261、減少 421）、EC で 736 個（増加 277、減少 459） 検出された。そのうち 4 種類のカテキンすべてで共通に発現変動した遺伝子は 87 個（増加 32、減少 55）であった。抽出された発現変動遺伝子の中には、*VEGFA*、*ETS1*、を始め *Akt1*、*MMP14*、*NES*、*IQGAP1*、*FN1* などの血管新生と関与する可能性のある遺伝子が含まれていた。さらに、DAVID による遺伝子オントロジー（Gene Ontology ; GO）解析の結果から、発現変動した遺伝子群は、血管を新生する過程に関与する生物学的機能を有しており、パスウェイ解析ソフトを用いて血管新生に関与する Canonical Pathway について検討した結果、血管新生に関与する幾つかの Canonical pathway との関連性が示された。

2. カテキン類が血管新生関連因子による血内皮機能障害に及ぼす影響

HUVEC に 4 種類のカテキン（EGCG、ECG、EGC、EC）50 μ M を 6 時間作用させたのちに、Vascular endothelial growth factor（VEGF）25 nM で細胞を刺激した。まず、血管周囲の基底膜を分解することにより血管新生を構築することが知られている matrix metalloprotease（MMP）の mRNA 発現量について検討したところ、カテキン類は VEGF 添加で亢進した MMP-14、MMP-2 の mRNA 発現量を抑制した。さらに、VEGF 刺激により炎症性サイトカインである interleukin-6（IL-6）、炎症促進作用をもつプラスタグランジン合成酵素である cyclooxygenase-2（COX-2）の発現が促進されたが、カテキン類の添加により抑制された。また、VEGF の刺激による血管内皮細胞への単球接着について測定したところ、カテキン類の添加により、接着分子の mRNA 発現ならびにタンパク質発現が抑制され、単球接着も有意に抑制された。さらに、カテキン類は VEGF 刺激で亢進した細胞増殖を抑制した。また、*ETS1*、*MAPK1*、*MAPK3* などの血管新生関連因子の mRNA 発現量の測定

を行ったところ *ETS1* において、VEGF 刺激で発現が増加した mRNA に対して EGCG、ECG で顕著な抑制効果が認められた。

続いて、細胞増殖、血管新生、炎症反応の増強に関与する小胞体ストレス関連因子に注目し、カテキン類の効果を検証した。その結果 VEGF 刺激で増加した小胞体ストレスマーカー、C/EBP homologous protein (CHOP)、glucose-regulated protein 78 (GRP78) の mRNA 発現はカテキン添加により抑制された。

以上のことよりカテキン類、特に EGCG は血管内皮細胞において、VEGF 刺激下における血管新生や血管炎症を抑制し、血管内皮機能調節作用を示す可能性が示唆された。

3. 健常成人における緑茶抽出物摂取時の血管内皮機能及び LDL 酸化への影響

緑茶カテキンのヒトでの作用を明らかにするために、1 g のカテキンを含む Green Tea Extract (GTE) カプセル、プラセボカプセルを用いて、健常成人を対象とした二重盲検のクロスオーバー試験を実施した。GTE 摂取が血管内皮機能に与える影響と血中カテキン濃度、LDL 酸化抑制効果について検討した。GTE 摂取後、摂取前に比べて血中カテキン濃度は顕著に増加し、血漿の総抗酸化力は増加したが、血管内皮機能に与える影響について、血流依存性血管拡張反応 (flow-mediated vasodilatation; FMD) を測定した結果、GTE 摂取による FMD 改善作用は認められなかった。一方で LDL 被酸化能の指標である lag time を測定した結果、GTE 摂取 1 時間後には摂取前に比べて LDL の酸化が有意に抑制された。続いて GTE 摂取後にカテキンが LDL 分画に結合するかどうか明らかにするために、健常成人女性 5 名に対し、GTE 摂取試験を行い、LDL 分画中のカテキン濃度を測定した。その結果 GTE 摂取前に比べて摂取後で LDL 中のカテキン濃度は上昇していることが示された。このことから、緑茶やカテキン摂取による LDL 酸化抑制効果は、LDL 粒子へのカテキン蓄積が寄与している可能性が示唆された。

本研究の成果から、緑茶カテキンは、血管内皮機能調節作用ならびに LDL 酸化の抑制作用などの多面的な作用により、動脈硬化の発症・進展過程において予防効果を発揮する可能性が示唆された。