

## ポリフェノール類による血管組織形成抑制作用とそのメカニズム

日大生産工 (院)    ○島崎 貴大    日大医学    萩倉 一博  
日大医学            松本 太郎    日大生産工    野呂 知加子

## 1. 緒言

重症虚血疾患患者を対象とする細胞治療による血管新生促進療法や、がんにおける血管新生抑制療法など、血管新生のコントロールは、さまざまな疾患治療に有効である。本研究は、血管新生の制御のために、血管組織形成を促進または抑制する分子について、その効果を定量的に解析し、その作用機序を明らかにすることを目的とする。ここでは、低分子有機化合物であるポリフェノール類について、その血管組織形成抑制効果およびそのメカニズムについて検討したので報告する。

血管新生を伴う疾患としては、増殖性糖尿病網膜症、加齢黄斑変性症、未熟児網膜症など眼内血管新生病や、慢性関節リウマチなどがあり、いずれも難病性である。特にがんでは、がん細胞が血管新生誘導因子を分泌し、固形腫瘍の周辺に新生血管が形成されると、酸素と栄養が供給されて腫瘍は大きく成長することが知られている。さらにはがん細胞が悪性化すると、血管壁に浸潤し、血流に乗って転移する場合もある。従って、腫瘍周辺の血管新生を抑制する事が出来れば、癌細胞の増殖や転移を防ぐ事が出来ると考えられている。

血管形成を管理する重要な因子は、血管内皮細胞増殖因子 (Vascular Endothelial Growth Factor: VEGF) であり、内皮細胞の増殖・移動・分化の重要な血管形成反応を管理している。VEGF は VEGFR と呼ばれるレセプターに結合し、細胞内シグナル伝達を経て、血管内皮細胞増殖と血管分化を促進する。さらに細胞内シグナル伝達には、様々な分子が関与し、影響することが知られている。

ポリフェノール類は植物が生成する2次代謝産物であり、植物界に広く分布する。ヒトは食品として、野菜、果物、穀類等から1日に数百mgを摂取しているとされている。ポリフェノール類は様々な生理機能を持ち、その一つに抗酸化作用が知られている<sup>1)</sup>。また、複数のベンゼン環が重合しているため、活性酸素種を吸収し、細胞内シグナル伝達において、酵素の阻害など様々な作用が知られている<sup>2)</sup>。これまでに、ある種のポリフェノールやフラボノイドが血管新生抑制作用を持つという報告が複数ある一方で、血管新生促進作用があるという報告もある<sup>3),4)</sup>。

本研究では、血管新生の研究において広く使用されている正常ヒト臍帯静脈内皮細胞 (Normal Human Umbilical Vein Endothelial Cells: HUVECs) を培養し、VEGF存在下で、ポリフェノールおよびフラボノイドの血管組織形成に対する影響について検討した。フラボノイドであるアピゲニンとケルセチン、ルテオリン、ポリフェノールであるレスベラトロールを用いた。また、ポリフェノール類が、VEGFからの血管内皮細胞内シグナル伝達にどのように関わって、血管新生抑制効果を示しているのか、そのメカニズムを明らかにするために、SIRT1, eNOS, COX-1, COX-2<sup>5)</sup>等に着目した遺伝子発現解析を行った。

## 2. 実験

## 2.1 免疫組織染色及び、数値解析

血管新生キット (クラボウ) を用いて、血管内皮細胞増殖因子 (VEGF) 存在下で、正常ヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVECs) の培養を行った。24穴ウェルプレートに、VEGF+アピゲニンを2.0 $\mu$ M・1.0 $\mu$ M・0.5 $\mu$ M・0.25 $\mu$ Mを加えた。

## Suppressing Effect of Polyphenols on Angiogenesis

Takahiro SHIMAZAKI, Kazuhiro HAGIKURA,  
Taro MATSUMOTO and Chikako YOSHIDA-NORO

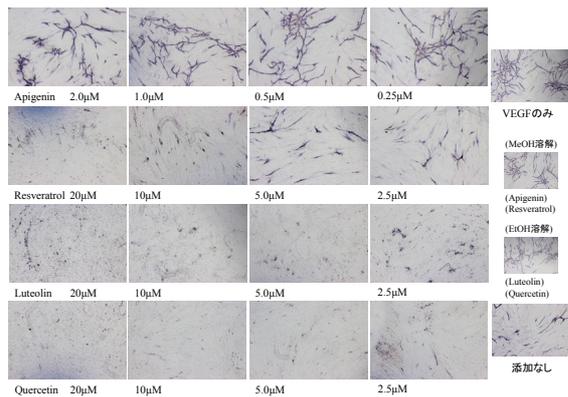


Fig. 1 Suppressing Effects of Polyphenols on Angiogenesis

HUVECs were cultured and treated with various concentrations of polyphenols or flavonoids respectively. Apigenin and Resveratrol are solved in methanol and Luteolin and Quercetin are solved in ethanol. Luteolin and Quercetin showed remarkable effects.

また、VEGF+ルテオリン、VEGF+ケルセチン、VEGF+レスベラトロールを各々20µM・10µM・5.0µM・2.5µMと濃度別に各ウェルプレートに添加し、11日間の培養を行った。その後、管腔形成のマーカーであるCD31 (PECAM-1) を用いて免疫組織染色を行い、顕微鏡撮影画像を、専用解析ソフトウェアを用いて、血管組織構造における管腔長・管腔面積・管腔交差点数・パス本数の4種の数値解析を行った。

## 2.2 遺伝子発現解析

上記と同様に、血管新生キット (クラボウ) を用いて、HUVECsの培養を行った。24穴ウェルプレートに、VEGF+アピゲニンを2.0µM・0.25µMを加えた。また、VEGF+ルテオリン、VEGF+ケルセチン、VEGF+レスベラトロールを各々20µM・2.5µMと濃度別に各ウェルプレートに添加し、11日間の培養を行った。その後、各ウェルから細胞を回収し、QIAGEN kitを用いてRNAを抽出し、RT-PCR法によりSIRT1, eNOS, COX-1, COX-2等や、血管組織のマーカーに着目した遺伝子発現解析を行った。

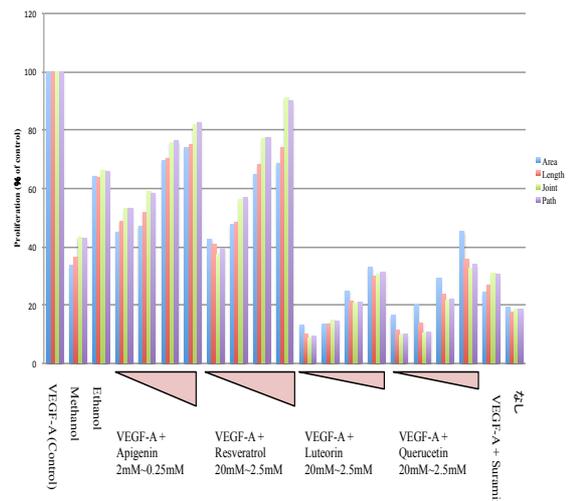


Fig. 2 Results of quantitative analysis  
The results of quantitative analysis by using KURABO Angiogenesis Image Analyzer.

## 3. 結果及び考察

免疫組織染色及び、血管新生定量ソフトウェアを用いた数値解析では、ポリフェノール類添加によって血管形成が抑制されている事がわかった (Fig. 1)。さらに、定量解析結果から、ポリフェノール類添加濃度に依存して抑制作用が認められた。特にルテオリンとケルセチンによる血管形成阻害は顕著であった (Fig. 2)。

ポリフェノール類は、フリーラジカル電子対を吸収し、細胞内シグナル伝達において、酵素の阻害など様々な作用が知られている。本講演では、血液中の酸化ストレス及び活性酸素との関連性を遺伝子発現解析による結果・考察と併せて報告する。

## 【参考文献】

- 1) Myoung H. Kim. *Journal of Cellular Biochemistry* **89**, 529-538 (2003)
- 2) Eleni Bagli *et al.*, *Cancer Research* **64**, 7936-7946 (2004)
- 3) Cheng Jiang, Rajesh Agarwal *et al.*, *Biochemical and Biophysical Research Communications* **276**, 371-378(2000)
- 4) Kai Heng Lam *et al.*, *Journal of Cellular Biochemistry* **112**, 3313-3321 (2011)
- 5) GuiFu Wu *et al.*, *Cardiovascular Research* **69**, 512-519 (2006)