

論文の内容の要旨

論文題目 ルテオリンの心血管系保護作用についての研究

氏名 中山 敦子

【序文】

植物由来のフラボノイドは強力な抗酸化作用を有するとともに様々なチロシンキナーゼ活性を修飾制御することが知られ、各種病態に対する効果についても検討が進んでいる。本研究ではフラボノイドの中でも最も強力な抗炎症作用を有するとされるルテオリンに着目し、特に体内への吸収効率が高いルテオリン 1 配糖体を使用して、心臓をはじめとする臓器の線維化抑制効果ならびに大動脈瘤形成抑制効果を動物実験で観察するとともに、分子生物学的機序の解析をおこなった。

【方法】

in vivo :

ラット高血圧モデル:9 週齢 Sprague-Dawley ラットの皮下に浸透圧ミニポンプを植え込み、アンジオテンシン II (Ang II) を 1 週間 $0.7 \mu\text{g/kg/min}$ で持続注入しラット高血圧モデルを作成した。Ang II+ルテオリン混餌群はポンプ植え込み 3 週間前よりルテオリン 1 配糖体混餌(配合率 0.05%、以下同様)を前投与した。比較対照として、対照群(普通餌、Ang II 注入なし)と Ang II+普通餌群(普通餌、Ang II 注入あり)を準備した。ポンプ植え込み 1 週間後に、ラットの血圧、および心エコーでの左室壁厚と左室内径、体重、心臓重量を測定した。心臓および大動脈組織の活性酸素産生を観察するために、組織凍結切片をもちいて 2',7'-dichlorofluorescein (DCFH)染色を行った。摘出した心臓、肝臓、腎臓の各臓器は組織学的に評価し、TGF β 1、CTGF、ANP、BNP、TNF α 、MCP-1 の mRNA 発現をリアルタイム PCR 法にて評価した。さらに心臓組織は、マクロファージ数測定のためフローサイトメトリー解析(FACS)にて CD3 陰性の細胞を抽出し、CD68 陽性、CD11b 陽性細胞の比率を観察した。

ApoE-/-マウス大動脈瘤モデル:16 週齢 ApoE-/-マウスの皮下に浸透圧ミニポンプを植え込み、Ang II を 4 週間 $1.0 \mu\text{g/kg/min}$ で持続注入し大動脈瘤モデルを作成した。Ang II+ルテオリン混餌群はポンプ植え込み 3 週間前よりルテオリン 1 配糖体混餌を前投与した。比較

対照として、対照群(普通餌、Ang II 注入なし)と Ang II+普通餌群(普通餌、Ang II 注入あり)を準備した。ポンプ植え込み直前と 4 週間後に、エコーにて大動脈最大短径を測定し、摘出した大動脈の TGF β 1、CTGF の mRNA 発現をリアルタイム PCR 法にて評価し、EVG 染色にて大動脈壁を組織学的に評価した。

in vitro :

培養ヒト心臓線維芽細胞を用いて、ルテオリン前処置が Ang II 刺激後の分子マーカー誘導および遺伝子発現に対しいかなる効果を及ぼすかを評価した。Ang II (0.1 μ M) 刺激 24 時間後に回収した細胞を用いて TGF β 1、CTGF、TNF α 、MCP-1 の mRNA 発現をリアルタイム PCR 法にて評価し、MAPK ファミリーである JNK1、ERK1/2、p38 のリン酸化を Western blotting 法で評価した。

【結果】

ラット高血圧モデル：ルテオリン投与は Ang II による血圧上昇を抑制しなかったが、左室壁肥厚、左室重量増加、心筋組織線維化を抑制し、左室における ROS 産生や TGF β 1、CTGF、ANP、BNP の mRNA 発現増加をいずれも有意に抑制した。TNF α 、MCP-1 の mRNA 発現増加に対する抑制効果は有意水準に達しなかったものの、左室組織 FACS 解析ではルテオリンが Ang II によるマクロファージ増加を抑制することを確認した。培養ヒト心筋線維芽細胞において Ang II 刺激による TGF β 1、CTGF の mRNA 発現亢進と JNK1、ERK1/2 のリン酸化は、ルテオリン前処置によって有意に抑えられた。一方、p38 リン酸化は前処置ルテオリン濃度が 20 μ M に達するまでは抑制されなかった。肝臓において、ルテオリン投与は Ang II による組織線維化を抑制し、TGF β 1、CTGF、TNF α 、MCP-1 の mRNA 発現を有意に抑制した。腎臓では、ルテオリン投与により、Ang II による組織線維化が血管周囲で抑制されたが、TGF β 1、CTGF、TNF α 、MCP-1 の mRNA 発現の有意な抑制は認められなかった。

ApoE-/-マウス大動脈瘤モデル：ルテオリン投与したマウスの瘤の発生率は投与しなかったマウスに比較して低かった(対照群 n=0/5、Ang II+普通餌群 n=10/10、Ang II+ルテオリン混餌群 n=2/10)。組織学的には、Ang II+普通餌群では大動脈中膜の弾性板の断絶と、Ang II+ルテオリン混餌群では弾性板の断絶はほとんど見られなかった。大動脈の TGF β 1、CTGF の mRNA 発現は Ang II+普通餌群に比較し、Ang II+ルテオリン混餌群で有意に低下していた。

【考察】

本研究では、特に強力な抗炎症作用を有することで知られるルテオリンに着目し、動物モデルで病態形成に与える効果を検証した。安定で吸収効率の高いルテオリン一配糖体を Ang II 負荷ラットモデルに投与したところ、血圧に影響なく心臓、肝臓、腎臓の線維化が有意に抑制された。ただしその効果には臓器間相違があり、肝臓において最も顕著に線維化抑

制効果が観察された。このことはルテオリン 1 配糖体がルテオリンアグリコンとして吸収されるため、活性体に代謝されるのに必要な β グルクロニダーゼ酵素が肝臓に豊富に存在することと関連しているのかもしれない。線維化抑制の分子メカニズムとして抗炎症作用以外に、MAPK ファミリーリン酸化に対する直接の、あるいは抗酸化作用を介した間接の抑制作用も考えられるが、詳細に関しては今後のさらなる検討を要する。また、ApoE-/-マウス大動脈瘤モデルにおいてルテオリンの明らかな瘤形成抑制効果を示すことができた。大動脈瘤は無症状のまま発症拡大し、破裂に至って始めて緊急手術で救命されるという経過を取るものも多い。無症状の患者への長期間の投与ということを考えると、心肥大、大動脈瘤ともにわれわれが既に経口摂取している食品栄養素で副作用なく長期間投与が可能、しかも病態進行を抑制可能な物質が予防治療薬として待望される。本研究で効果が検証されたルテオリン経口投与は心臓線維化予防や大動脈瘤予防に有望な方策と考えられる。今後さらに詳細な機序解明をおこない、安全性を検証した後、臨床試験へと展開させたいと考える。