

プロシアニジンが酸化 LDL と LOX-1 の結合を阻害し、 血管壁脂質沈着を抑制する

Procyanidins blocking oxidized LDL-LOX-1 interaction inhibit arterial lipid deposition

善本亮, 西塚太一, 中野厚史, 藤田佳子,
垣野明美, 高谷智英, 沢村達也*

Ryo Yoshimoto, Taichi Nishizuka, Atsushi Nakano, Yoshiko Fujita,
Akemi Kakino, Tomohide Takaya, Tatsuya Sawamura

Abstract

LOX-1 is an endothelial receptor for oxidized LDL (oxLDL), which plays proatherogenic roles in the development of cardiovascular diseases. To obtain tools for manipulating LOX-1 activities, we screened more than 400 foodstuff extracts. Most of the foodstuff extracts which showed strong LOX-1 inhibitory effects were known to be rich in procyanidins, such as grape seed extracts and apple polyphenol fraction. Indeed, purified procyanidins significantly inhibited oxLDL binding to LOX-1. *In vivo*, chronic administration of oligomeric procyanidins *per os* significantly suppressed lipid accumulation in vascular wall in hypertensive rats which were fed high fat diet. These results suggest that procyanidins are LOX-1 inhibitors, and they protect arterial wall from lipid accumulation, which might illustrate the well-known vascular protective effects of red wine, French paradox.

Keywords

LOX-1
cardiovascular diseases
lipid accumulation
procyanidin
French paradox

キーワード

LOX-1
心血管病
脂質沈着
プロシアニジン
フレンチパラドックス

はじめに

動脈硬化症は脳梗塞や心筋梗塞に代表される心血管病の最大の原因である。動脈硬化症の発

* 国立循環器病研究センター血管生理学部

症・進展には遺伝的背景に加え、高脂血症や高血圧・糖尿病などの基礎疾患と喫煙などの生活習慣が非常に複雑に関与している。動脈硬化症が高脂血症や高血圧などと最も異なる点は、いわゆる初期の動脈硬化性病変と呼ばれるものは健常人でも幼少期から存在すること、また通常の診断方法ではその存在・程度を確認することができず、多くの場合、知らぬ間に進展していくことにあると言える。動脈硬化巣の形成には、血管内皮細胞の障害や平滑筋の増殖・遊走など血管を構築する細胞の機能・器質的变化に加え、血小板接着や凝集、マクロファージやリンパ球などの血管壁への浸潤など様々な細胞が関係しており、形成された粥種の破綻、およびそれによる小血管の閉塞が脳梗塞や心筋梗塞を引き起こすと考えられている。

レクチン様酸化 LDL 受容体 (LOX-1) は我々が血管内皮細胞より同定した 1 回膜貫通型受容体である [1]。我々はこれまで、LOX-1 が動脈硬化の初期段階と考えられている内皮障害を引き起こす受容体であること、また、動脈硬化症になりやすいマウスから LOX-1 を遺伝的に欠損させたり、血中 LOX-1 リガンド量を低下させると、実際に動脈硬化症になりにくくなることを明らかにしてきた [2-8]。LOX-1 は、高血圧・高脂血症・糖尿病など、心血管病の危険因子と呼ばれる条件下で非常に強く発現が誘導される [9-13]。病態時における LOX-1 は、内皮細胞だけでなく平滑筋、血小板、マクロファージや心筋細胞にまで発現が認められ、平滑筋増殖、血小板凝集、泡沫化細胞の形成といった動脈硬化巣の進展を引き起こすとともに、虚血再灌流後の心筋傷害と言った疾患の発症そのものにも直接関与していることが明らかとなっている [14-24]。近年我々は、血中の可溶性 LOX-1 濃度と LOX-1 リガンドを測定し、これらの値の積 (LOX Index) が脳卒中および冠動脈疾患の発症を非常によく予測する予測マーカーとなることを見出した [25]。したがって、LOX-1 はヒトにおいても動脈硬化性疾患の発症に関与しているものと考えられる。

現在までのところ、高脂血症や高血圧の治療は行われているが、動脈硬化症の治療薬は存在しない。これには、動脈硬化巣が非常に長い年月をかけて形成されるため、直接の創薬標的としにくい点が理由の一つとして挙げられる。また、動脈硬化巣の程度を大規模で定量的に評価する優れた方法が現在のところ存在しないため、仮に動脈硬化の有望な治療薬が開発されたとしても、それをヒトで評価することが困難であるということも関係している。LOX-1 は動脈硬化巣の形成とともに、動脈硬化性疾患の発症にも直接関与していることから、LOX-1 を阻害することで疾患の発症を抑えとともに、疾患の根本的原因である動脈硬化巣の形成を抑制することが期待できる。本研究は、酸化 LDL と LOX-1 の結合阻害能を持つ物質を食品由来物質より同定すること、また、その予防医学的観点からの応用を図ることを目的として行った。

方法

1) リポタンパクの調整

低密度リポタンパク質 (LDL, density: 1.019 ~ 1.063 g/ml) は健常人血漿より超遠心法により

調整した。酸化 LDL は LDL を 7.5 μ M 硫酸銅と 37°C で 16 時間反応させることにより作成した。作成した酸化 LDL のうち一部は 1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorate (DiI) で標識し使用した (DiI 酸化 LDL)。

2) プロシアニジンの調整

プロシアニジンはリンゴポリフェノール分画より過去の報告に基づき調整した [26, 27]。

3) ELISA を用いた LOX-1 阻害食品素材の 1 次評価

食品抽出物 (437 種) および、アミノ酸などの食品成分で市販されている試薬 (35 種) (まとめて食品素材と呼ぶ) の LOX-1 と酸化 LDL の結合に対する阻害活性を、ELISA を用いて検出した。すなわち、プレート上に固相化した組換えヒト LOX-1 蛋白 (アミノ酸 61-273) と酸化 LDL との結合をペルオキシダーゼ標識抗ヒト apoB 抗体によって検出し、これに対する添加食品素材の影響を解析した [25]。粉末の食品素材、ミクロスパーテル 1 杯分を 1 ml の DMSO に溶解し、遠心後の上清をサンプルとして用いた。サンプルは 5% BSA, 2 mM EDTA を含む 10 mM HEPES, 150 mM NaCl (pH7.0) に 50 倍希釈し、酸化 LDL が最終的に 1 μ g/ml になるように混合し LOX-1 ELISA を行った。サンプル存在下における結合は、サンプル無添加時における酸化 LDL と LOX-1 の結合を 100% として算出した。

4) ヒト LOX-1 発現細胞を用いた食品素材の 2 次評価

テトラサイクリン誘導型ヒト LOX-1 安定発現細胞株 (LOX-1-CHO) と標識酸化 LDL を用い、LOX-1-CHO における DiI 酸化 LDL の取り込みを指標にして、細胞における酸化 LDL と LOX-1 の結合に対する食品素材の影響を検討した [28]。試験前日にドキシサイクリン (1 μ g/ml) 存在下で 96 ウェルプレートに細胞を撒種し、10% FBS を含む Ham's F-12 培地にて培養した。試験当日、FBS 不含培地で細胞を洗浄した後、10 μ g/ml の食品素材を 37 度で 1 時間処置した。洗浄した細胞に DiI 酸化 LDL (10 μ g/ml) を 37 度で 2 時間処理し、洗浄後 10% ホルマリンで固定を行い、4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) による核染色を行った。細胞に付帯する DiI 酸化 LDL は IN Cell アナライザー (GE Healthcare) を用い撮影し、食品素材非存在下における 1 細胞当たりの蛍光強度を 100% として数値化した。

5) LOX-1-CHO 細胞における DiI 酸化 LDL の結合

LOX-1-CHO と DiI 酸化 LDL の結合は、DiI 酸化 LDL の処置を 45 分間、および手順を全て氷冷下で行った以外、上記 4) と同法で試験・解析を行った。

6) 動物試験

8 週齢の脳卒中易発症高血圧ラット (SHRSP/Izm) および対照の Wistar Kyoto ラット

(WKY/Izm) (SHR 等疾患モデル共同研究会) に高脂肪食を給餌し、飲料水として生理食塩水を与えた。一定期間給餌後、ジエチルエーテルもしくはイソフルラン麻酔を用いて動物を安楽死させ、大静脈より採血した。生理食塩水で全身還流を行った後、腸間膜動脈を含む腸間膜を摘出し試験に用いた。腸間膜動脈への脂質沈着に対する影響を検討するため、抗 LOX-1 抗体 (TS20, 10 mg/kg) およびマウス IgG (10 mg/kg, Sigma-Aldrich) を高脂肪食負荷開始直前、および負荷 4 日後に尾静脈から投与し、1 週間後に解剖を行った。プロシアニジンは生理食塩水に 0.5% の濃度で溶解し、解剖までの間 2 週間与えた。プロシアニジン血中濃度の測定のため、プロシアニジン付与 2 日目の 7:00 ~ 8:00 に採血を行った。全ての動物は個別で飼育し、 $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$, 7:00 ~ 19:00 明期の下自由に摂食・飲水させた。血圧はテイルカフ法 (BP-98A, Softron) にて測定し、中性脂肪、総コレステロール、高密度リポタンパク質およびチオバルビツール酸反応物質 (TBARS) は市販のキットを用いて測定した (脂質, Wako; TBARS, Zeptrometrix corporation)。

7) オイルレッド O 染色

腸間膜動脈への脂質沈着を検出するためにオイルレッド O による染色を行った。腸間膜より腸間膜動脈を単離し 10% ホルマリンで固定を行った。60% イソプロパノール内で 5 分間処理した後、0.18% オイルレッド O 染色を行った。尾部より分枝 8 本分の動脈における脂質の沈着数を顕微鏡下で数え、脂質沈着量とした。

8) 定量的 PCR

腸間膜動脈の LOX-1 mRNA 量を定量的 PCR を用いて測定した。総 RNA よりランダムヘキサマーと SuperScript III RNase H-reverse transcriptase (Invitrogen) を用いて cDNA を作成し、ラット LOX-1 配列に特異的なプライマーセットとクエンチャー (Rn00591116) および TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems) を用いて定量的 PCR を行った。LOX-1 mRNA の発現量は GAPDH mRNA 量で補正して定量した。

9) ホールマウント免疫染色

腸間膜動脈断片を 2% ホルマリンで固定後、1 mg/ml ディスパーゼ、2% ホルマリン / 0.2% Triton X-100, メタノールおよび 0.1% Triton X-100 にて順次処理した。ブロッキング後、Cy3 標識した抗 LOX-1 抗体もしくは、ネガティブコントロールとして、Cy3 標識マウス IgG で染色した。血管はアルコールで段階的に脱水後、ホールマウントイメージを共焦点顕微鏡にて撮影した。

結果

LOX-1 阻害活性を含む食品素材の探索

LOX-1 阻害活性を含む食品素材の探索のため、本研究では民間療法やサプリメントとして利用されている食品素材を多く含む合計 472 種を評価した (図 1)。まず、LOX-1 と酸化 LDL の結合に対する食品素材の影響を、ELISA にて検討したところ、52 素材が酸化 LDL の結合を 70%以上阻害した。次に、LOX-1-CHO を用いて DiI 酸化 LDL (10 µg/ml) の取り込みを指標に LOX-1 と酸化 LDL の結合阻害能を検討した。DiI 酸化 LDL の取り込みは LOX-1 を発現しない CHO では認められず、LOX-1-CHO でのみ観察された。本条件下において、上記 52 素材のうち 26 素材 (10 µg/ml) が DiI 酸化 LDL の取り込み阻害を 70%抑制した (表 1)。

活性成分の同定

DiI 酸化 LDL の取り込み阻害が強かった食品素材には、ブドウ種子、松樹皮、ピーナツ種皮やリングポリフェノールなど「高プロシアニジン含有食品」としてよく知られているものが多く含まれていた。このことから、プロシアニジン類が LOX-1 と酸化 LDL の結合を抑制することが想定された。プロシアニジンはポリフェノールの 1 種であり、その中で Flavan-3-ol が 4-8 位もしくは 4-6 位の炭素間で繰り返し縮合した構造を持つ化合物の総称である (図 2)。そこで、強く阻害した食品素材の一つであるリングポリフェノールを用いて、LOX-1-CHO への DiI 酸化 LDL の結合を指標にその活性成分の同定を行った。

リングポリフェノールは用量依存的に LOX-1-CHO への DiI 酸化 LDL の結合を抑制した (IC_{50} , 102 ng/ml) (図 3A)。リングポリフェノールにはプロシアニジン類が最も多く含まれているが、単量体に相当する (エピ) カテキンやその他の成分も 20%程度含まれている (図 3B)。そこでまず、リングポリフェノールを (エピ) カテキンとプロシアニジンの混合分画、フェノールカルボン酸分画、その他の成分 3 つに分画し、LOX-1-CHO への DiI 酸化 LDL (10 µg/ml) 結合阻害能を検討した (各分画はいずれも 100 ng/ml)。その結果、カテキン含有プロシアニジン分画のみが結合阻害活性を示した (図 3C)。更に、カテキン含有プロシアニジン分画より単量体相当の (エピ) カテキンと、2 量体から 7 量体のプロシアニジンを調整し、LOX-1-CHO への DiI 酸化 LDL の結合 (10 µg/ml) に対する影響を検討した (図 3D)。その結果、3 量体以上のプロシアニジン類は 27~61 ng/ml の IC_{50} の範囲でいずれも DiI 酸化 LDL の結合を抑制した。2 量体プロシアニジンも DiI 酸化 LDL の結合を抑制したが、その IC_{50} は 330 ng/ml と 3 量体以上と比較して弱かった。一方、(エピ) カテキンには結合阻害活性が全く見られなかった。

プロシアニジン類を構成する (エピ) カテキンには不斉炭素が存在するため、各重合度のプロシアニジンには様々な光学異性体が存在する。3 量体を例にとり、リングポリフェノールに含まれる代表的な光学異性体 4 種の DiI 酸化 LDL と LOX-1-CHO の結合に対する影響を検討した。その結果、いずれの光学異性体も同程度の阻害活性を示した (図 4)。3 量体プロシアニ

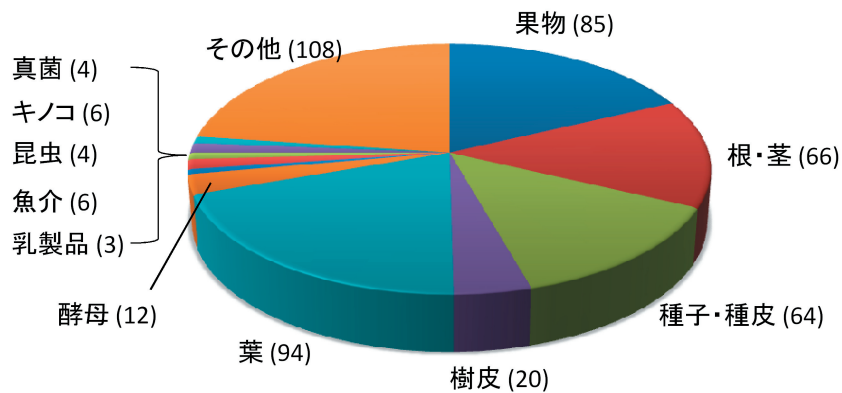


図1 LOX-1 ELISA に使用した食品素材の由来。評価した素材数を括弧内の数字で示してある。

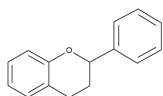
表1 LOX-1-CHO における Dil 酸化 LDL の取り込みを 70%以上抑制した食品素材のリスト。類似の食品素材であっても抽出方法が異なっていたり不明であるため、異なる食品素材として扱い評価を行った。似たような食品素材には上付き数字を添付し、それぞれのメーカーを最下段に表示した。プロシアニジンを含む食品素材であることがよく知られているものは太字で示してある。

食品素材	阻害率 (%)
黒大豆種皮	99
プロポリス	98
ブドウ種子由来プロアンソシアニジン ¹	98
ブドウ種子 ²	98
ピーナツ種皮 ³	98
リンゴ濃縮タンニン	97
ブドウ種子 ⁴	97
ピーナツ種皮 ⁵	97
フランス海岸松樹皮	96
ブドウ種子 ⁶	95
ニュージーランド産松樹皮 ⁶	95
ブドウ種子 ⁷	91
リンゴポリフェノール	88
ザクロ葉	86
ルイボス茶	84
マンゴスチン果皮	83
わさび葉	80
イチヨウ葉	80
ビルベリー ⁶	78
ビルベリー ⁵	76
グアバ葉	76
ヤマブドウ	76
ウラジロガシ	76
松樹皮	75
ホップポリフェノール	73
キャットクロー	72

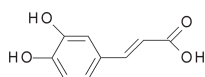
¹ キッコーマン, ² サングロブフード, ³ 岸本産業, ⁴ ヘキストマリオンセル, ⁵ 常磐植物化学研究所, ⁶ インデナジャパン, ⁷ チカインダストリー

ポリフェノール

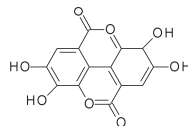
フラボノイド類



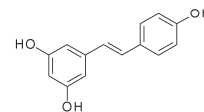
フェノールカルボン酸類



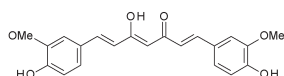
エラグ酸類



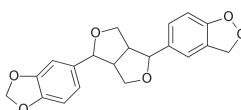
スチルベノイド類



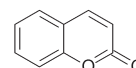
クルクミン酸類



リグナン類

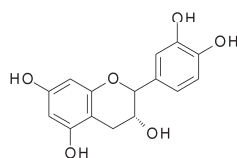


クマリン類

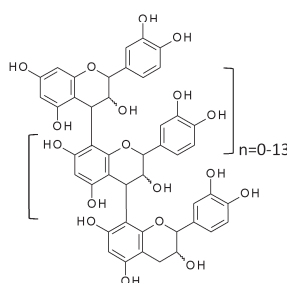


リンゴポリフェノールに含まれるフラボノイド

カテキン・エピカテキン



プロシアニジン



その他フラボノイド

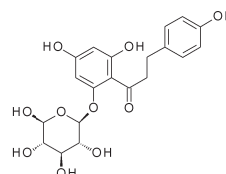


図2 ポリフェノールの代表的な構造とリンゴポリフェノールに含まれる代表的なフラボノイドおよびプロシアニジンの構造。

ジンの一つであるプロシアニジン C1 の阻害活性に対する IC_{50} は、DiI 酸化 LDL の濃度が 10 $\mu\text{g/ml}$ の時は、73 ng/ml であったが、DiI 酸化 LDL 濃度が 3 $\mu\text{g/ml}$, 1 $\mu\text{g/ml}$ と低くなると、 IC_{50} も 26 ng/ml, 7 ng/ml と低下した。また、プロシアニジン C1 による DiI 酸化 LDL の消光効果は 300 ng/ml で 20% 以下であった。

In vivo におけるプロシアニジンの効果

In vitro で酸化 LDL と LOX-1 の結合阻害を示す物質が、*in vivo* でも必ず効果を示すとは限らない。*In vivo* で効果を示すためには、その物質の物理化学的・薬物動態学的な性質の他に、適した動物モデルを用いて評価しているかという点も非常に大きな要因として関わってくる。

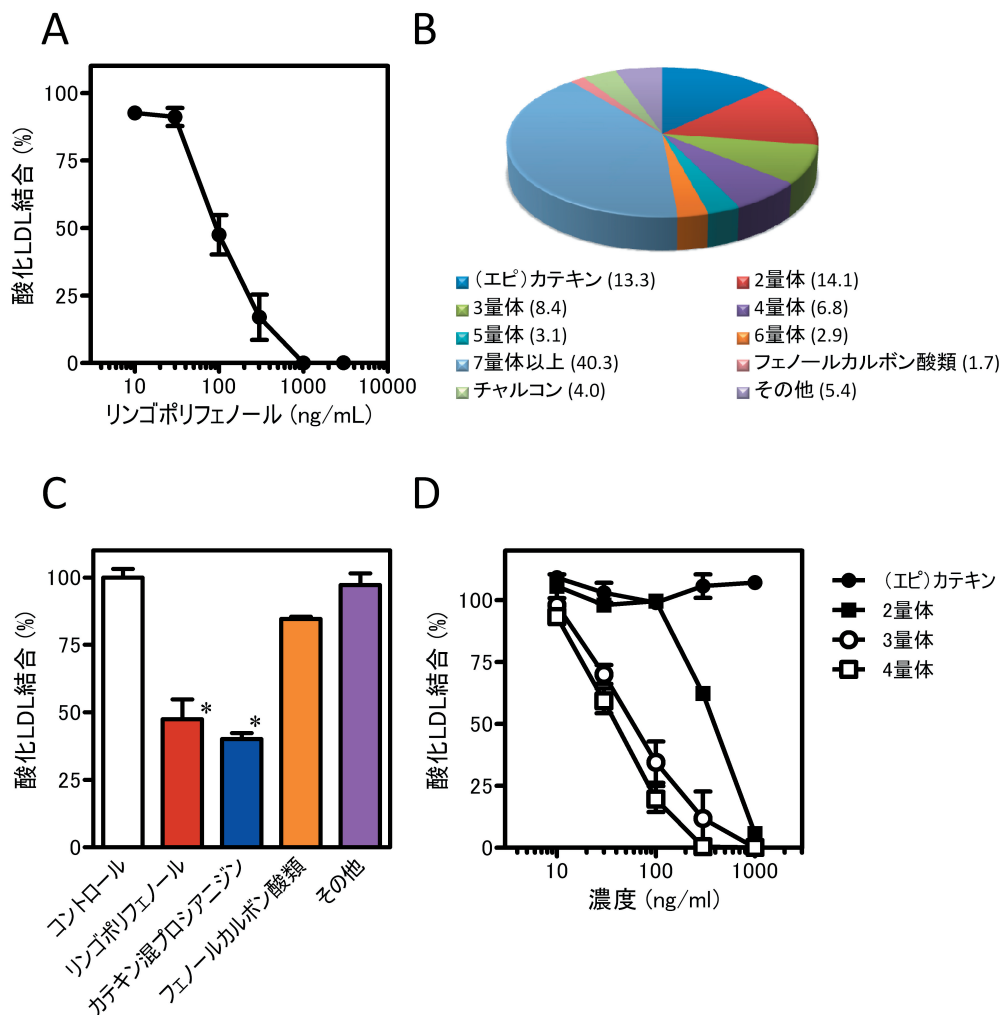
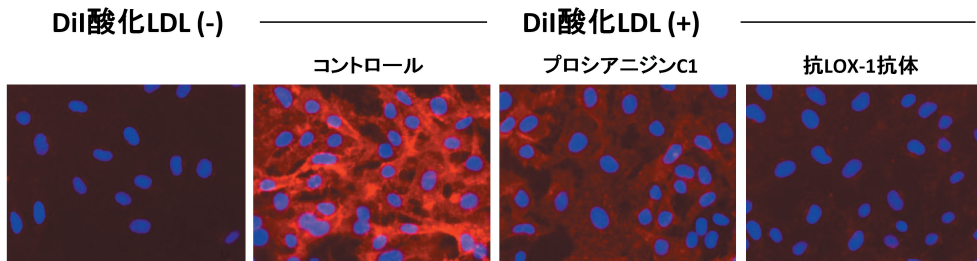


図3 プロシアニジンによる酸化LDLとLOX-1-CHOの結合阻害。A: リンゴポリフェノールによるDiI酸化LDLとLOX-1-CHOの結合阻害。B: リンゴポリフェノール内に含まれるフラボノイド量(パーセント)を文献26に従いグラフ化した。C: リンゴポリフェノール内の各分画を用いたDiI酸化LDLとLOX-1-CHOの結合阻害。D: 各重合度のプロシアニジンによるDiI酸化LDLとLOX-1-CHOの結合阻害。5量体以上の結果は、グラフが煩雑になるため載せていない。

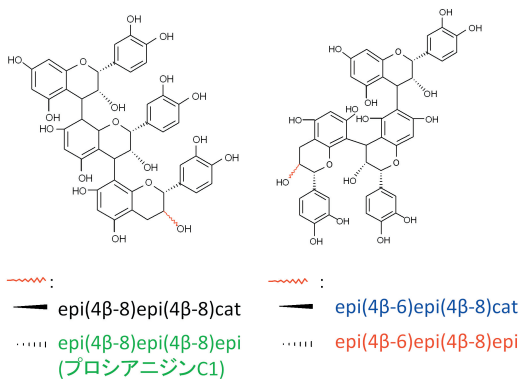
すなわち、物質そのものが標的臓器に達しなければその物質による薬理作用は発揮されえず、また、適した疾患モデルを選択しなければ効果も見られない。

LDL 受容体欠損マウスは動脈硬化形成モデルとして最も利用されている動物モデルの一つである。LOX-1 遺伝子欠損マウスと LDL 受容体欠損マウスを掛け合わせたマウスは動脈硬化抵抗性であるため、LDL 受容体欠損マウスにプロシアニジンを与えると動脈硬化抑制効果が期待できる [3]。しかしながら、LDL 受容体欠損マウスにおける動脈硬化巣の形成には長期間の高脂肪食の負荷が必要となり、薬剤の効果を検証する動物モデルとしてはあまり適当ではな

A



B



C

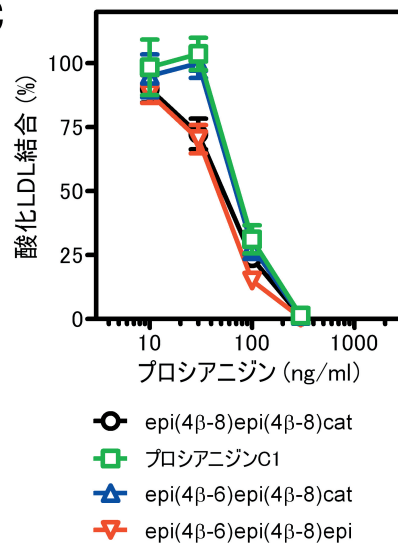


図4 3量体プロシアニジンによる DiI 酸化 LDL と LOX-1-CHO の結合阻害。A: DiI 酸化 LDL と LOX-1-CHO 細胞の結合の蛍光顕微鏡写真。B: 3 量体プロシアニジンの構造と名称。epi, エピカテキン；cat, カテキン。C: 各 3 量体プロシアニジンの DiI 酸化 LDL と LOX-1-CHO の結合に対する影響。

い。そこで、短期間でモデルの作成および薬効評価ができ、かつ、動脈硬化症を近似した動物モデルの選定、およびそのモデルが LOX-1 の阻害を観察することに適しているかどうかの検討をまず行った。

自然発症高血圧ラット (SHR) やその亜系である脳卒中易発症高血圧ラット (SHRSP) は、食塩・高脂肪食の負荷によって腸間膜動脈に著明な脂質沈着を呈することが古くから知られている [29, 30]。これらの動物の大動脈や頸動脈などでは LOX-1 が非常に高発現していることから [10, 31, 32], 同ラットの腸間膜動脈における脂質沈着には LOX-1 が関与しているのではないかと考え、本モデルについて詳細に検討を行った。まず、SHRSP の腸間膜動脈の LOX-1 発現量を対照ラットである WKY と比較したところ、SHRSP の腸間膜動脈では LOX-1 mRNA

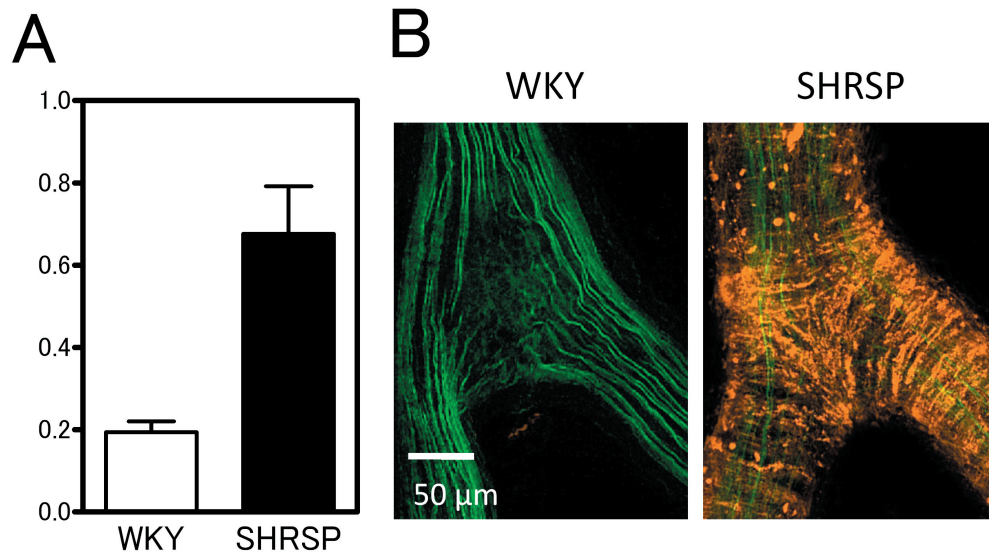


図5 SHRSP および WKY の腸間膜動脈における LOX-1 の発現。A: 定量的 PCR による LOX-1 mRNA 量, B: ホールマウント免疫染色による LOX-1 タンパク (オレンジ)。緑色は自家蛍光由来の弾性繊維。

およびタンパクの発現が著しく亢進していた (図 5)。次に SHRSP および WKY に食塩・高脂肪食を負荷し、負荷 1, 2, 5 週間後に解剖を行ったところ、SHRSP においてのみ負荷期間の長さに応じて腸間膜動脈への脂質沈着が観察された (図 6A, 6B)。次に、本ラットの脂質沈着に対する LOX-1 の機能的な関与を検討するため、酸化 LDL と LOX-1 の結合を阻害する抗 LOX-1 抗体を用いた [4, 5, 33, 34]。高脂肪食負荷直前より抗 LOX-1 抗体をラットに繰り返し投与し、負荷後 1 週間における血管壁を観察したところ、脂質沈着数が抗 LOX-1 抗体投与によって著明に抑制された (図 6C, 6D)。また、摘出腸間膜動脈を用いた結果により、血管壁の LOX-1 の抑制が血管壁への脂質沈着を抑制することも明らかとなった [11]。以上の結果より、SHRSP 腸間膜動脈の脂質沈着には血管壁の LOX-1 が関与していること、また、モデルの形成および LOX-1 の阻害効果が短期間で評価できることが分かった。

最後に SHRSP の腸間膜動脈脂質沈着に対するプロシアニジンの効果を検討した。プロシアニジンは 2 量体以上の様々な長さのプロシアニジンを含む混合物を用い、生理食塩水に溶解して飲料水の代わりに与えた (0.5%)。試験期間の間、対照群、プロシアニジン群の間には摂餌量、体重、血圧、心拍数、総コレステロール、HDL コレステロール、中性脂肪、および過酸化脂質の指標である TBARS に違いは認められなかった。一方、腸間膜動脈の脂質沈着数を比較すると、プロシアニジン処置群で有意な低下が認められた (図 7)。解剖時において、プロシアニジン C1、および 2 量体プロシアニジンの一つであるプロシアニジン B2 の血中濃度はそれぞれ 4.9 ± 1.9 ng/ml, 7.9 ± 1.8 ng/ml であった。

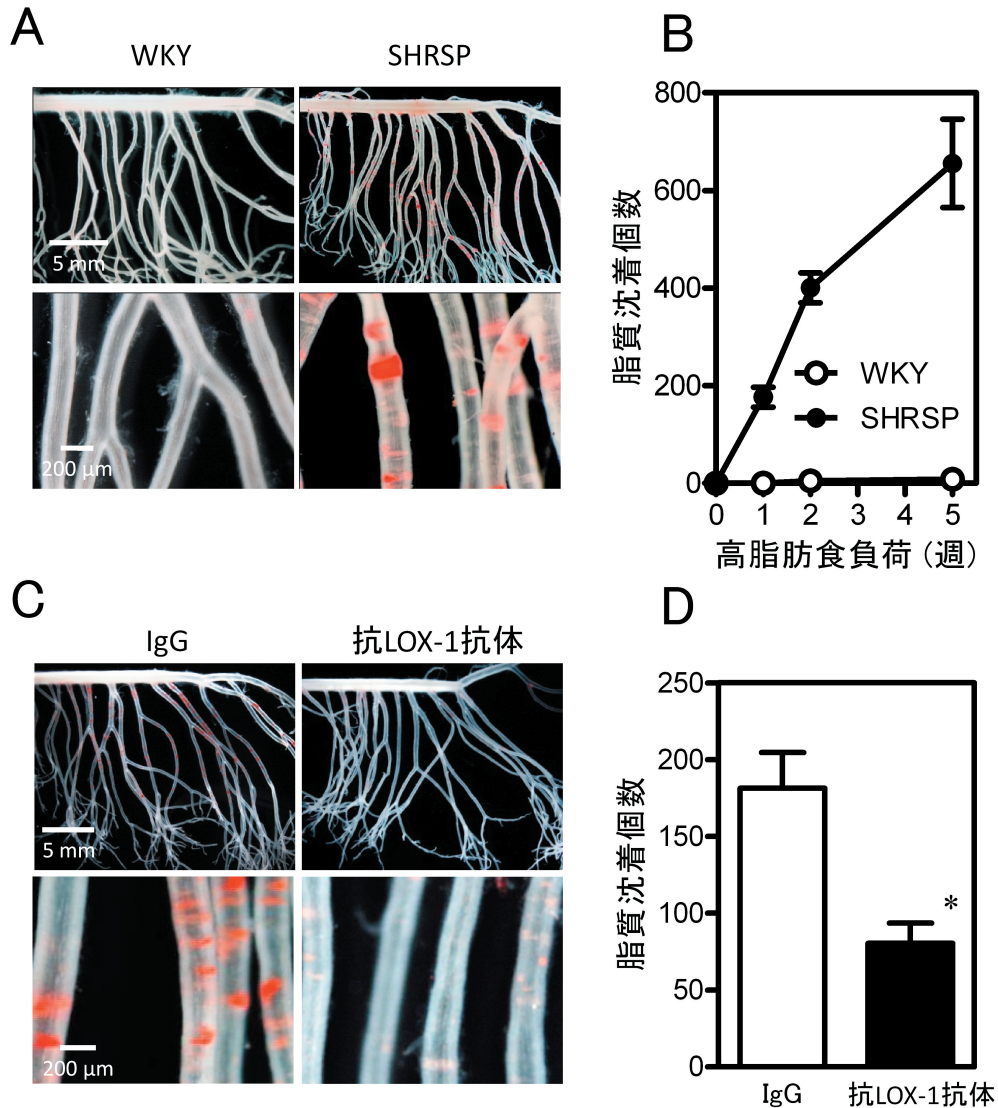


図6 SHRSP および WKY の腸間膜動脈の脂質沈着と抗 LOX-1 抗体の影響。A, B: SHRSP および WKY に高脂肪食・食塩水を負荷し、負荷後2週間後の腸間膜動脈のオイルレッドO染色像 (A) および、1, 2, 5 週間後の腸間膜動脈における脂質沈着数 (B)。C, D: 抗 LOX-1 抗体および IgG を処置した SHRSP の腸間膜オイルレッドO染色像および脂質沈着数。

考察

酸化 LDL と LOX-1 の結合を阻害する物質を見つけ出すことを目的として、400 種類以上の食品素材の評価を行ったところ、阻害する食品素材にはプロシアニジン高含有素材として知られているものが多く含まれていた。実際に、精製したプロシアニジン類は酸化 LDL と LOX-1 の結合を非常に強く抑制し、また、SHRSP においては抗 LOX-1 抗体と同様に腸間膜動脈の脂質沈着を抑制した。今日まで、心血管保護作用のある天然物由来フラボノイドのいくつか

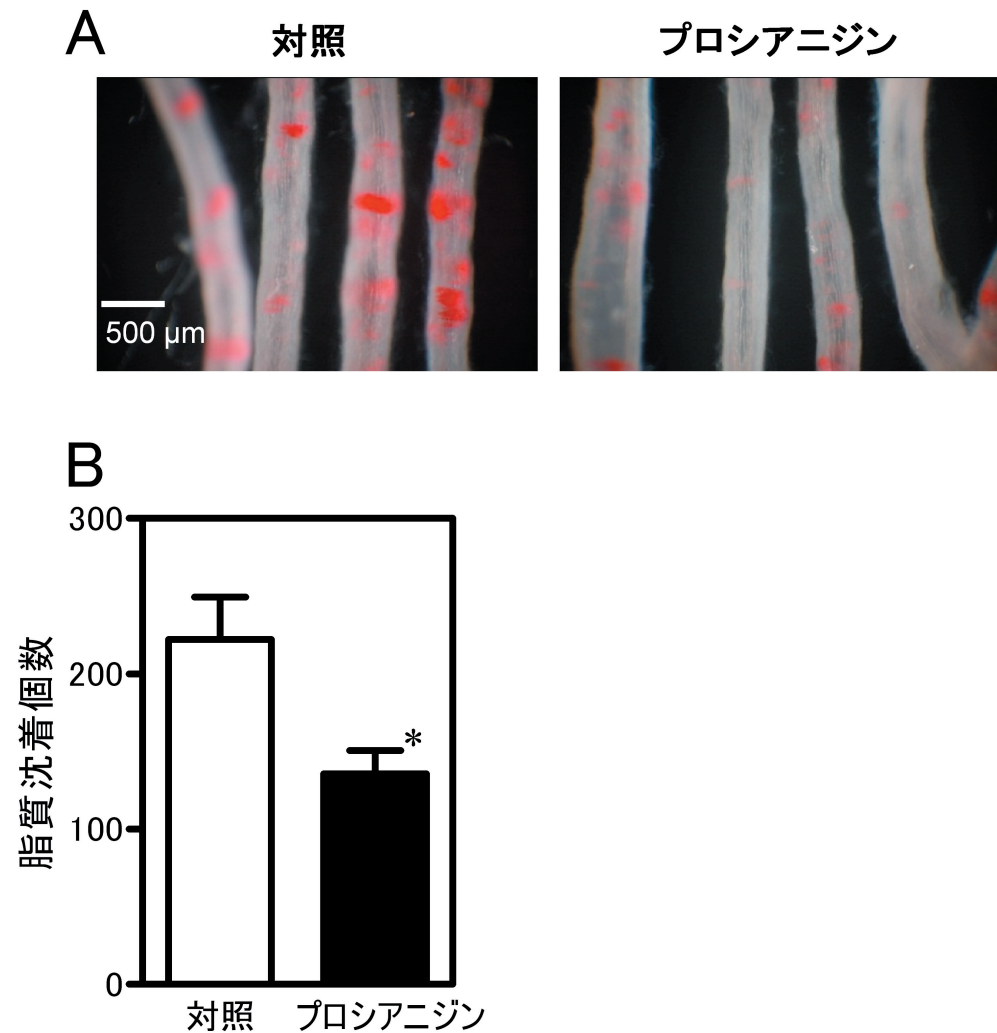


図7 プロシアニジン投与個体およびコントロール群における SHRSP 腸間膜動脈のオイルレッド O 染色像 (A) 及び、脂質沈着数 (B)。

に、酸化 LDL の生理作用や LOX-1 の発現量を抑制する効果があることが知られているが、それらの標的分子は分かっていない [35-39]。また、酸化 LDL と LOX-1 を阻害する小分子の報告は合成品を含めても本結果が初めてである。

プロシアニジン類による酸化 LDL と LOX-1 の結合阻害効果は、3 量体以上のプロシアニジンではほぼ同等だった。2 量体プロシアニジンの阻害活性は 3 量体以上と比較すると IC₅₀ で 5 ~ 10 倍低下したが、それでもなお、1 μg/ml で酸化 LDL と LOX-1 の結合を完全に抑制した。良好に消化管から吸収される化合物の分子量は一般に 500 ~ 600 程度までと考えられているが、プロシアニジンに関しては少なくとも 4 量体まで (分子量 1155) がラット経口投与後の血中に存在することが報告されている [26]。本試験において、血中に 5 ng/ml 程度のプロシア

ニジン C1、および 8 ng/ml 程度のプロシアニジン B2 が検出された。プロシアニジン C1 の量がリンゴポリフェノール内の全プロシアニジンの 6%程度であることを考えると [26]、血中には酸化 LDL と LOX-1 の結合を阻害できるプロシアニジン類がさらに多く存在し、薬効を示したものと想定できる。もしくは、SHRSP の血中酸化 LDL 濃度は数 100 ng/ml 程度であるため [11]、プロシアニジン C1 単独で酸化 LDL と LOX-1 の結合を十分に阻害していることも考えられる。

直接の標的分子は不明であるが、プロシアニジンには抗酸化作用、降圧作用、脂質低下作用などが報告されている [40-43]。SHRSP の腸間膜動脈への脂質の沈着は高脂肪食の負荷依存的であり、また、抗酸化剤の影響をも受けることを考えると、上記の薬理効果は血管壁への脂質沈着を抑制する可能性がある [11]。しかしながら本試験条件下では、プロシアニジンは血圧や血中脂質量および、過酸化脂質の指標である TBARS に影響を与えなかったことから、これらの作用を介して脂質沈着量が主に抑制された可能性は低いと思われる。一方で、LOX-1 は血管壁のみならず、消化管上皮細胞にも発現し、膵臓胆汁酸依存性リパーゼのトランスポーターとして機能していることが報告されている [44]。消化管上皮は大量のプロシアニジンに暴露されるため、プロシアニジンが消化管における LOX-1 の作用を抑制して血管壁脂質沈着を抑制した可能性もある。In vivo においてプロシアニジンが酸化 LDL と血管壁上の LOX-1 の結合を本当に抑制しているか、もしくは他の作用機序により血管壁の脂質沈着が抑制されたかを知るには、更なる研究が必要と思われる。

プロシアニジンはリンゴのみならず、赤ワインやココアなど心血管保護作用があると言われている食品にも多く含まれている [45]。Corder らは、人々が飲む赤ワイン中のプロシアニジン含量と長寿が関係すること、また、プロシアニジンが血管内皮細胞からのエンドセリン-1 の分泌を抑制することを示しており、プロシアニジンがフレンチパラドクスの実体である可能性を提唱している [46, 47]。LOX-1 刺激も同様、内皮細胞からのエンドセリン-1 を放出することが知られており [48]、フレンチパラドクスが「プロシアニジンによる酸化 LDL と LOX-1 の阻害」という作用機序で説明できる可能性は非常に興味深い。

結論

プロシアニジンは LOX-1 への酸化 LDL の結合を阻害し、プロシアニジンの摂取はラット血管壁の脂質沈着を抑制する。

参考文献

1. T. Sawamura, N. Kume, T. Aoyama, H. Moriwaki, H. Hoshikawa, Y. Aiba, T. Tanaka, S. Miwa, Y. Katsura, T. Kita, T. Masaki. An endothelial receptor for oxidized low-density lipoprotein. *Nature*. 386, 73-77, 1997
2. Y. Ishigaki, H. Katagiri, J. Gao, T. Yamada, J. Imai, K. Uno, Y. Hasegawa, K. Kaneko, T. Ogihara, H. Ishihara, Y. Sato, K. Takikawa, N. Nishimichi, H. Matsuda, T. Sawamura, Y. Oka. Impact of plasma oxidized low-density lipoprotein removal on atherosclerosis. *Circulation*. 118, 75-83, 2008

3. J. L. Mehta, N. Sanada, C. P. Hu, J. Chen, A. Dandapat, F. Sugawara, H. Satoh, K. Inoue, Y. Kawase, K.-i. Jishage, H. Suzuki, M. Takeya, L. Schnackenberg, R. Beger, P. L. Hermonat, M. Thomas, T. Sawamura. Deletion of LOX-1 reduces atherogenesis in LDLR knockout mice fed high cholesterol diet. *Circ. Res.* 100, 1634–1642, 2007
4. L. Cominacini, A. F. Pasini, U. Garbin, A. Davoli, M. L. Tosetti, M. Campagnola, A. Rigoni, A. M. Pastorino, V. Lo Cascio, T. Sawamura. Oxidized low density lipoprotein (ox-LDL) binding to ox-LDL receptor-1 in endothelial cells induces the activation of NF-kappaB through an increased production of intracellular reactive oxygen species. *J Biol Chem.* 275, 12633–12638, 2000
5. L. Cominacini, A. Rigoni, A. F. Pasini, U. Garbin, A. Davoli, M. Campagnola, A. M. Pastorino, V. Lo Cascio, T. Sawamura. The binding of oxidized low density lipoprotein (ox-LDL) to ox-LDL receptor-1 reduces the intracellular concentration of nitric oxide in endothelial cells through an increased production of superoxide. *J Biol Chem.* 276, 13750–13755, 2001
6. D. Li, J. L. Mehta. Upregulation of endothelial receptor for oxidized LDL (LOX-1) by oxidized LDL and implications in apoptosis of human coronary artery endothelial cells: evidence from use of antisense LOX-1 mRNA and chemical inhibitors. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 20, 1116–1122, 2000
7. D. Y. Li, H. J. Chen, E. D. Staples, K. Ozaki, B. Annex, B. K. Singh, R. Vermani, J. L. Mehta. Oxidized low-density lipoprotein receptor LOX-1 and apoptosis in human atherosclerotic lesions. *J Cardiovasc Pharmacol Ther.* 7, 147–153, 2002
8. D. Li, L. Liu, H. Chen, T. Sawamura, J. L. Mehta. LOX-1, an oxidized LDL endothelial receptor, induces CD40/CD40L signaling in human coronary artery endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 23, 816–821, 2003
9. M. Nagase, J. Abe, K. Takahashi, J. Ando, S. Hirose, T. Fujita. Genomic organization and regulation of expression of the lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor (LOX-1) gene. *J Biol Chem.* 273, 33702–33707, 1998
10. M. Nagase, S. Hirose, T. Sawamura, T. Masaki, T. Fujita. Enhanced expression of endothelial oxidized low-density lipoprotein receptor (LOX-1) in hypertensive rats. *Biochem Biophys Res Commun.* 237, 496–498, 1997
11. A. Nakano, N. Inoue, Y. Sato, N. Nishimichi, K. Takikawa, Y. Fujita, A. Kakino, K. Otsui, S. Yamaguchi, H. Matsuda, T. Sawamura. LOX-1 mediates vascular lipid retention under hypertensive state. *J. Hypertens.* 28, 1273–1280, 2010
12. Y. Kuge, N. Kume, S. Ishino, N. Takai, Y. Ogawa, T. Mukai, M. Minami, M. Shiomi, H. Saji. Prominent lectin-like oxidized low density lipoprotein (LDL) receptor-1 (LOX-1) expression in atherosclerotic lesions is associated with tissue factor expression and apoptosis in hypercholesterolemic rabbits. *Biol Pharm Bull.* 31, 1475–1482, 2008
13. M. Chen, M. Nagase, T. Fujita, S. Narumiya, T. Masaki, T. Sawamura. Diabetes enhances lectin-like oxidized LDL receptor-1 (LOX-1) expression in the vascular endothelium: possible role of LOX-1 ligand and AGE. *Biochem Biophys Res Commun.* 287, 962–968, 2001
14. H. Kataoka, N. Kume, S. Miyamoto, M. Minami, M. Morimoto, K. Hayashida, N. Hashimoto, T. Kita. Oxidized LDL modulates Bax/Bcl-2 through the lectinlike Ox-LDL receptor-1 in vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 21, 955–960, 2001
15. H. Eto, M. Miyata, N. Kume, M. Minami, H. Itabe, K. Orihara, S. Hamasaki, S. Biro, Y. Otsuji, T. Kita, C. Tei. Expression of lectin-like oxidized LDL receptor-1 in smooth muscle cells after vascular injury. *Biochem Biophys Res Commun.* 341, 591–598, 2006
16. H. Yoshida, N. Kondratenko, S. Green, D. Steinberg, O. Quehenberger. Identification of the lectin-like

- receptor for oxidized low-density lipoprotein in human macrophages and its potential role as a scavenger receptor. *Biochem J.* 334, 9–13, 1998
17. D. F. Schaeffer, M. Riaz, K. S. Parhar, J. H. Chen, V. Duronio, T. Sawamura, U. P. Steinbrecher. LOX-1 augments oxLDL uptake by lysophosphatidylcholine-stimulated murine macrophages but is not required for oxLDL clearance from plasma. *J Lipid Res.* 2009
18. J. Ishiyama, R. Taguchi, A. Yamamoto, K. Murakami. Palmitic acid enhances lectin-like oxidized LDL receptor (LOX-1) expression and promotes uptake of oxidized LDL in macrophage cells. *Atherosclerosis.* 2009
19. M. Chen, M. Kakutani, T. Naruko, M. Ueda, S. Narumiya, T. Masaki, T. Sawamura. Activation-dependent surface expression of LOX-1 in human platelets. *Biochem Biophys Res Commun.* 282, 153–158, 2001
20. M. R. Marwali, C. P. Hu, B. Mohandas, A. Dandapat, P. Deonikar, J. Chen, I. Cawich, T. Sawamura, M. Kavdia, J. L. Mehta. Modulation of ADP-induced platelet activation by aspirin and pravastatin: role of lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1, nitric oxide, oxidative stress, and inside-out integrin signaling. *J Pharmacol Exp Ther.* 322, 1324–1332, 2007
21. J. Hinagata, M. Kakutani, T. Fujii, T. Naruko, N. Inoue, Y. Fujita, J. L. Mehta, M. Ueda, T. Sawamura. Oxidized LDL receptor LOX-1 is involved in neointimal hyperplasia after balloon arterial injury in a rat model. *Cardiovasc Res.* 69, 263–271, 2006
22. E. H. Yao, N. Fukuda, T. Ueno, H. Matsuda, K. Matsumoto, H. Nagase, Y. Matsumoto, A. Takasaka, K. Serie, H. Sugiyama, T. Sawamura. Novel gene silencer pyrrole-imidazole polyamide targeting lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1 attenuates restenosis of the artery after injury. *Hypertension.* 52, 86–92, 2008
23. D. Li, V. Williams, L. Liu, H. Chen, T. Sawamura, T. Antakli, J. L. Mehta. LOX-1 inhibition in myocardial ischemia-reperfusion injury: modulation of MMP-1 and inflammation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 283, H1795–1801, 2002
24. K. Kataoka, K. Hasegawa, T. Sawamura, M. Fujita, T. Yanazume, E. Iwai-Kanai, T. Kawamura, T. Hirai, T. Kita, R. Nohara. LOX-1 pathway affects the extent of myocardial ischemia-reperfusion injury. *Biochem Biophys Res Commun.* 300, 656–660, 2003
25. N. Inoue, T. Okamura, Y. Kokubo, Y. Fujita, Y. Sato, M. Nakanishi, K. Yanagida, A. Kakino, S. Iwamoto, M. Watanabe, S. Ogura, K. Otsui, H. Matsuda, K. Uchida, R. Yoshimoto, T. Sawamura. LOX Index, a novel predictive biochemical marker for coronary heart disease and stroke. *Clin. Chem.* 56, 550–558, 2010
26. T. Shoji, S. Masumoto, N. Moriichi, H. Akiyama, T. Kanda, Y. Ohtake, Y. Goda. 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
27. T. Shoji, S. Masumoto, N. Moriichi, T. Kanda, Y. Ohtake. 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
28. Y. Fujita, A. Kakino, N. Nishimichi, S. Yamaguchi, Y. Sato, S. Machida, L. Cominacini, Y. Delneste, H. Matsuda, T. Sawamura. Oxidized LDL receptor LOX-1 binds to C-reactive protein and mediates its vascular effects. *Clin Chem.* 55, 285–294, 2009
29. Y. Yamori. Pathogenesis of spontaneous hypertension as a model for essential hypertension. *Jpn Circ J.* 41, 259–266, 1977
30. Y. Yamori, R. Horie, M. Sato, M. Fukase. Hypertension as an important factor for cerebrovascular atherogenesis in rats. *Stroke.* 7, 120–125, 1976

31. Y. Hamakawa, N. Omori, M. Ouchida, M. Nagase, K. Sato, I. Nagano, M. Shoji, T. Fujita, K. Abe. Severity dependent up-regulations of LOX-1 and MCP-1 in early sclerotic changes of common carotid arteries in spontaneously hypertensive rats. *Neurol Res.* 26, 767–773, 2004
32. M. Nagase, S. Kaname, T. Nagase, G. Wang, K. Ando, T. Sawamura, T. Fujita. Expression of LOX-1, an oxidized low-density lipoprotein receptor, in experimental hypertensive glomerulosclerosis. *J Am Soc Nephrol.* 11, 1826–1836, 2000
33. S. Kanata, M. Akagi, S. Nishimura, S. Hayakawa, K. Yoshida, T. Sawamura, H. Munakata, C. Hamanishi. Oxidized LDL binding to LOX-1 upregulates VEGF expression in cultured bovine chondrocytes through activation of PPAR-gamma. *Biochem Biophys Res Commun.* 348, 1003–1010, 2006
34. M. Honjo, K. Nakamura, K. Yamashiro, J. Kiryu, H. Tanihara, L. M. McEvoy, Y. Honda, E. C. Butcher, T. Masaki, T. Sawamura. Lectin-like oxidized LDL receptor-1 is a cell-adhesion molecule involved in endotoxin-induced inflammation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100, 1274–1279, 2003
35. Y. Shibata, N. Kume, H. Arai, K. Hayashida, A. Inui-Hayashida, M. Minami, E. Mukai, M. Toyohara, A. Harauma, T. Murayama, T. Kita, S. Hara, K. Kamei, M. Yokode. Mulberry leaf aqueous fractions inhibit TNF- α -induced nuclear factor κ B (NF- κ B) activation and lectin-like oxidized LDL receptor-1 (LOX-1) expression in vascular endothelial cells. *Atherosclerosis.* 193, 20–27, 2007
36. M. Bao, Y. Lou. Flavonoids from seabuckthorn protect endothelial cells (EA.hy926) from oxidized low-density lipoprotein induced injuries via regulation of LOX-1 and eNOS expression. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 48, 834–841, 2006
37. V. Mollace, S. Ragusa, I. Sacco, C. Muscoli, F. Sculco, V. Visalli, E. Palma, S. Muscoli, L. Mondello, P. Dugo, D. Rotiroli, F. Romeo. The protective effect of bergamot oil extract on lecithine-like oxLDL receptor-1 expression in balloon injury-related neointima formation. *J. Cardiovasc. Pharmacol. Ther.* 13, 120–129, 2008
38. W.-J. Lee, H.-C. Ou, W.-C. Hsu, M.-M. Chou, J.-J. Tseng, S.-L. Hsu, K.-L. Tsai, W. H.-H. Sheu. Ellagic acid inhibits oxidized LDL-mediated LOX-1 expression, ROS generation, and inflammation in human endothelial cells. *Journal of Vascular Surgery.* 52, 1290–1300, 2010
39. H.-C. Ou, T.-Y. Song, Y.-C. Yeh, C.-Y. Huang, S.-F. Yang, T.-H. Chiu, K.-L. Tsai, K.-L. Chen, Y.-J. Wu, C.-S. Tsai, L.-Y. Chang, W.-W. Kuo, S.-D. Lee. EGCG protects against oxidized LDL-induced endothelial dysfunction by inhibiting LOX-1-mediated signaling. *Journal of Applied Physiology.* 108, 1745–1756, 2010
40. J. M. D. Bas, M.-L. Ricketts, M. Vaqué, E. Sala, H. Quesada, A. Ardevol, M. J. Salvadó, M. Blay, L. Arola, D. D. Moore, G. Pujadas, J. Fernandez-Larrea, C. Bladé. Dietary procyanidins enhance transcriptional activity of bile acid-activated FXR in vitro and reduce triglyceridemia in vivo in a FXR-dependent manner. *Mol. Nutr. Food Res.* 53, 805–814, 2009
41. J. Buserrolles, E. Gueux, B. Balasińska, Y. Piriou, E. Rock, Y. Rayssiguier, A. Mazur. In vivo antioxidant activity of procyanidin-rich extracts from grape seed and pine (*Pinus maritima*) bark in rats. *Int. J. Vitam. Nutr. Res.* 76, 22–27, 2006
42. J. M. Del Bas, J. Fernandez-Larrea, M. Blay, A. Ardevol, M. J. Salvado, L. Arola, C. Blade. Grape seed procyanidins improve atherosclerotic risk index and induce liver CYP7A1 and SHP expression in healthy rats. *FASEB J.*, 479–481, 2005
43. G. A. Magos, J. C. Mateos, E. Pérez, G. Fernández, C. Lobato, C. Márquez, R. G. Enríquez. Hypotensive and vasorelaxant effects of the procyanidin fraction from *Guazuma ulmifolia* bark in normotensive and hypertensive rats. *J. Ethnopharmacol.* 117, 58–68, 2008
44. N. Bruneau, S. Richard, F. Silvy, A. Verine, D. Lombardo. Lectin-like ox-LDL receptor is expressed in

- human INT-407 intestinal cells: involvement in the transcytosis of pancreatic bile salt-dependent lipase. *Mol. Biol. Cell.* 14, 2861-2875, 2003
45. L. Gu, M. A. Kelm, J. F. Hammerstone, G. Beecher, J. Holden, D. Haytowitz, S. Gebhardt, R. L. Prior. Concentrations of proanthocyanidins in common foods and estimations of normal consumption. *J. Nutr.* 134, 613-617, 2004
46. R. Corder, J. A. Douthwaite, D. M. Lees, N. Q. Khan, A. C. Viseu dos Santos, E. G. Wood, M. J. Carrier. Health: Endothelin-1 synthesis reduced by red wine. *Nature.* 414, 863-864, 2001
47. R. Corder, W. Mullen, N. Q. Khan, S. C. Marks, E. G. Wood, M. J. Carrier, A. Crozier. Oenology: Red wine procyanidins and vascular health. *Nature.* 444, 566-566, 2006
48. K. Sakurai, L. Cominacini, U. Garbin, A. Fratta Pasini, N. Sasaki, Y. Takuwa, T. Masaki, T. Sawamura. Induction of endothelin-1 production in endothelial cells via co-operative action between CD40 and lectin-like oxidized LDL receptor (LOX-1). *J Cardiovasc Pharmacol.* 44 Suppl 1, S173-180, 2004