

研究区分: 予防に関する研究

丹波黒大豆由来ポリフェノールによる血管内皮細胞保護作用と動脈硬化予防

足立 孝臣

臨床医学講座 内科学ユニット

【目的】

丹波地方において名産物として知られる黒大豆は、その種皮部分を「黒豆衣」と呼ばれる生薬として、古くより利用されている。近年の報告においては、黒大豆煮汁の摂取が高血圧や高血糖を改善させること、黒大豆の薬効が種皮中に豊富に含まれるポリフェノールに因ることが明らかにされつつある。これまでポリフェノールに関する多数の研究がなされており、レスベラトロール・プロシアニジンなどに生理活性があることが示されている。特に、プロシアニジンは、その抗酸化作用により、血管内皮細胞の炎症を抑え、動脈硬化を抑制することが知られている。一方、マイクロ RNA は 21-25 塩基長の 1 本鎖 RNA 分子であり、真核生物において遺伝子の転写後発現調節に関与している。マイクロ RNA が介する転写抑制は、発生・細胞増殖・細胞分化・細胞死または細胞代謝といった、広範な生物学的プロセスに重要な役割を担うことが知られている。血管内皮細胞においても、マイクロ RNA による転写調節がなされているが、ポリフェノールによる血管内皮細胞マイクロ RNA の制御に関しては未だ解明されていない。

申請者は、「黒大豆由来ポリフェノールが、マイクロ RNA を介して、血管内皮細胞保護効果を発揮する」と仮説を立て、一昨年より研究を開始している。昨年までの成果として、プロシアニジン B2 が血管内皮細胞において遺伝子発現変化をきたす可能性を示し、さらにトロンビンにより惹起された血管内皮細胞の炎症に対して、プロシアニジン B2 が抑制的に働く可能性を示した。さらに、ヒト臍帯静脈血管内皮細胞 (HUVECs) に対し、プロシアニジンを添加し、全マイクロ RNA の発現量変化を網羅的に解析した。その結果、複数のマイクロ RNA において有意に発現低下を示し、プロシアニジンがマイクロ RNA の発現抑

制を介して血管内皮細胞における遺伝子発現を制御する可能性を示した。

【方法・結果・考察】

本年度において申請者は、HUVECs に対し、黒大豆ポリフェノールのうち大部分を占めるプロシアニジンを添加し、全メッセンジャー RNA の発現量変化を網羅的に解析した。変動遺伝子群を用いた Pathway 解析の結果、16 のシグナル経路に有意な変動を認めた。中でも、エンドセリン経路の変動を認め、プロシアニジンと血管内皮細胞の炎症の関連を示唆するものであった。最も有意な変動遺伝子群は Rhodopsin like GPCRs であり、類縁の植物由来色素であるアントシアニンがロドプシンの再合成を助けることを踏まえると、プロシアニジンにも同様の眼改善効果が有る可能性が示唆された (図 1)。

Pathway	p-value(mRNA)	Matched Entities(mRNA)	Pathway Entity
Hs.GPCRs_Class_A.Rhodopsin-like.WP455.106426	1.92E-05	50	262
Hs.Arrhythmic.Right.Ventricular.Cardiomypathy.WP211	0.003720252	16	74
Hs.Pathogenesis.of.SARS-CoV-2.Mediated.by.nsp8-nsp10.C	0.005011102	7	30
Hs.Oligodendrocyte.Specification.and.differentiation(including	0.006147747	8	31
Hs.Small.Lipid.GPCRs.WP247.102206	0.012329661	6	19
Hs.Striated.Muscle.Contraction.Pathway.WP383.105826	0.012363141	9	38
Hs.ACE.Inhibitor.Pathway.WP554.107642	0.029778864	5	17
Hs.mRNAs.in.Muscle.Cell.Differentiation.WP2012.82900	0.03132311	7	40
Hs.Gliol.Cell.Differentiation.WP2276.97827	0.031472985	3	8
Hs.Cancer.immunotherapy.by.PD-1.blockade.WP4585.10811	0.03157536	6	25
Hs.G.Protein.Signaling.Pathways.WP35.106737	0.033576198	16	92
Hs.I.L.1.and.megakaryocytes.in.obesity.WP2865.97642	0.038373858	6	24
Hs.Cell-type.Dependent.Selectivity.of.CCK2R.Signaling.WP31	0.0436083	4	13
Hs.MFAP5-mediated.ovarian.cancer.cell.motility.and.invasive	0.0436083	4	13
Hs.Development.of.pulmonary.dendritic.cells.and.macrophage	0.0436083	4	13
Hs.Cell-type.Dependent.Selectivity.of.CCK2R.Signaling.WP31	0.0436083	4	13
Hs.Development.of.pulmonary.dendritic.cells.and.macrophage	0.0436083	4	13
Hs.Phosphodiesterases.in.neuronal.function.WP4222.107161	0.043693475	10	52
Hs.Endothelin.Pathways.WP2197.94181	0.043696947	7	33

次に、microRNA 網羅的解析の結果と照らし合わせ、プロシアニジン→マイクロ RNA→メッセンジャー RNA のシグナルカスケードの候補を抽出した。両網羅的解析を組み合わせた Pathway 解析では、有意なシグナル経路を見出すことができなかった。次に、血管内皮細胞において十分発現し、既に動脈硬化との関連が指摘されている miR-21 に着目した。microRNA 網羅的解析により、プロシアニジンが miR-21 を有意に減少させることが示された。次に

MicroRNA Target Scan を用いて miR-21 の制御遺伝子群を抽出し、mRNA 網羅的解析結果と照らし合わせたところ、26 遺伝子に重複を認めた。現在これらの抽出された遺伝子群に対し、実際の変動並びに機能を解析している。さらに、microRNA 網羅的解析において最も大きな変動を示し、現時点で血管内皮細胞における機能が明らかでない miR-6753-3p に関して検討した (図 2)。

Name	ID	global normalization		z-score		比較①	1 vs 2		
		1	2	1	2		ratio	up	
hsa-miR-126-3p	MIMAT0000445	1929	624	6.34	5.03	-1.31	0.40	*	
hsa-miR-21-5p	MIMAT0000076	727	262	4.94	3.78	-1.16	0.45	*	
hsa-miR-100-5p	MIMAT0000098	574	284	4.59	3.90	-0.70	0.62		
hsa-miR-99a-5p	MIMAT0000097	454	230	4.26	3.59	-0.67	0.63		
hsa-miR-7e-5p	MIMAT0000414	181	69	2.93	1.86	-1.08	0.47	*	
hsa-miR-22-3p	MIMAT0000077	167	71	2.82	1.89	-0.93	0.52		
hsa-miR-26a-5p	MIMAT0000082	136	50	2.52	1.37	-1.14	0.45	*	
hsa-miR-16-5p	MIMAT0000069	134	41	2.50	1.11	-1.39	0.38	*	
hsa-miR-17-5p	MIMAT0000070	126	56	2.41	1.56	-0.85	0.55		
hsa-miR-30c-5p	MIMAT0000244	126	55	2.41	1.53	-0.87	0.55		
hsa-miR-29c-3p	MIMAT0000681	124	57	2.39	1.57	-0.82	0.57		
hsa-miR-106a-5p	MIMAT0000103	117	42	2.29	1.14	-1.15	0.45	*	
hsa-miR-6753-3p	MIMAT0027407	110	9	2.22	-1.04	-3.25	0.19	***	
hsa-miR-30a-5p	MIMAT0000087	109	52	2.19	1.45	-0.74	0.60		
hsa-miR-126-5p	MIMAT0000444	108	22	2.12	0.23	-1.89	0.27	*	

申請者は、HUVECs に対し $2\mu\text{M}$ のプロシアニジン B2 を添加し、添加後 24 時間にて細胞を回収した。対照群にはプロシアニジン溶液の溶媒のみを投与した。その結果、プロシアニジン添加群において、miR-6753-3p の有意な発現低下を認めた。次に、HUVECs に対しリポフェクションにより miR-6753-3p mimic を強制発現した。強制発現させた細胞において miR-6753-3p の発現量を確認したところ、十分なトランスフェクション効率を得ており、microRNA 導入が行えた。次に、これらの細胞について細胞形態の評価を行った。遺伝子導入後 1 日、3 日での観察を行なったが、いずれも強制発現群と比較対象群との間に有意な形態変化は認められなかった。

【論文及び学会発表】

本件に関して、今年度の論文及び学会発表はありません。