

# 論文内容の要旨

論文題目 The beneficial effects of sulforaphane on the vascular functions

和訳 スルフォラファンの血管保護作用に関する研究

指導教員 永井 良三 教授

東京大学大学院医科系研究科

平成 19 年 4 月入学

医学博士課程

内科学専攻

氏名 稲島 司

## 1. 背景

心血管疾患の多くは動脈硬化に起因し、日本をはじめとする先進諸国において死亡原因の高い割合を占める。動脈硬化を進展させる因子のひとつとして酸化ストレスが知られることから、動脈硬化・心血管疾患の予防および治療戦略として抗酸化物質に期待が寄せられ、事実、さまざまな抗酸化物質の効能が検討されている。抗酸化物質としては、薬剤だけではなく、既に日常摂取されている野菜や果物に含まれる成分への期待も強い。野菜や果物の摂取による心血管疾患予防効果が報告され各種ガイドラインでも積極的摂取が薦められてはいるものの、どの成分が有効か、どのくらいの量を摂取するのがよいのか、等わかっていない部分も多い。

心血管疾患と並んで、罹患率・死亡率の高い疾患として癌があるが、野菜や果物を積極的に摂取することでそのリスクが低下することが疫学調査で示されてきた。特にブロッコ

リーなどアブラナ科野菜の摂取と癌発症率は逆相関し、さらに癌病巣の拡大をも抑制するという報告がみられる。ブロッコリー発芽早期のスプラウトから抽出されたスルフォラファン(sulforaphane, 1-isothiocyanato-4-methylsulfinylbutane)は強力な抗酸化作用を有することが知られ、特に基礎実験において様々な組織での癌の退縮が示されている。スルフォラファンはふつう植物細胞内にグルコラファニンという前駆体として存在するが、調理や咀嚼などを契機に、同じく植物細胞内に含まれる酵素ミロシナーゼによる加水分解を受けて活性体へと化学変化する(本文 Fig 1)。活性体になり細胞内に取り込まれたスルフォラファンは転写因子 Nrf2 の核内移行を促進、核内に移行した Nrf2 は heme oxygenase-1 (HO-1)など抗酸化酵素遺伝子のプロモーター領域に結合し、抗酸化酵素を誘導、その結果、細胞や組織に保護的に働くと考えられている (本文 Fig 2)。このようにおもに癌細胞で詳細な検討が加えられてきたスルフォラファンではあるが、心血管系に関する保護作用に関してはデータが乏しい。

## 2. 目的

本研究の目的は、スルフォラファンが血管機能を改善させうるか、血管傷害後の反応性にいかなる影響を与えるか、動脈硬化を抑えることが出来るのかなど、血管組織に対する保護作用について *in vivo* で検証することである。さらに培養血管内皮細胞を用いてスルフォラファンの抗酸化作用、抗炎症作用を確認する。

## 3. 方法

1) ApoE 遺伝子欠損マウス(動脈硬化モデル)でスルフォラファン経口投与が大動脈壁在プラーク形成を改善するかを検討した。

- 2) ラット頸動脈のバルーン傷害モデル(ラット総頸動脈内腔を 2Fr フォゴティールバルーンカテーテルで擦過し、2 週間後に同部位を採取し新生内膜増生の程度を評価する実験系)でみられる反応性新生内膜形成がスルフォラファン投与により抑制されるかを検討した。
- 3) Ang II 持続負荷高血圧ラットモデルを用いた実験でスルフォラファン投与が Ang II 負荷で惹起される血管壁 ROS 産生亢進を改善するか、血管内皮機能障害を回復させるかを検討した。
- 4) 培養ヒト大動脈血管内皮細胞(HAEC)を用いて、スルフォラファン添加による抗酸化酵素 HO-1 遺伝子の発現誘導を確認した。さらに TNF $\alpha$  添加による MCP-1, VCAM1, ICAM1 など炎症メディエーター・細胞接着因子の発現誘導がスルフォラファン添加により抑制されるかを、濃度依存性反応を含め検討した。

## 4. 結果

### 1) ApoE 遺伝子欠損マウス(動脈硬化モデル)

ApoE<sup>-/-</sup>マウス(オス)に 2 ヶ月間高用量のコレステロールとバターを食餌負荷することで、大動脈壁にプラークが形成され、大動脈基部にもプラーク沈着が認められた。この負荷食に 0.002%スルフォラファンを追加配合した群では、体重や血中総コレステロールおよび中性脂肪値に有意な変化は認められないものの、大動脈壁、大動脈基部におけるプラーク形成はいずれも有意に減少し(本文 Fig 10, 11)、スルフォラファン経口摂取による抗動脈硬化作用が示された。

### 2) ラット頸動脈バルーン傷害モデル

普通飼育ラットに総頸動脈バルーン傷害を施すと 2 週間後に新生内膜増生が認められる。

バルーン傷害直後からスルフォラファン 5 mg/kg/day を 3 日に 1 回(2 週間の期間中計 5 回) 腹腔内に投与したところ、新生内膜増生は有意に抑制され、血管内腔は有意に広く保たれた(本文 Fig. 14)。

### 3) Ang II 持続負荷高血圧ラットモデル

Ang II を皮下植え込み型浸透圧ポンプにより 1 週間持続負荷し高血圧(収縮期血圧 約 200 mmHg)を惹起したラットでは、血管壁全層の ROS 産生が亢進し、内皮依存性血管拡張反応が低下した。スルフォラファンの腹腔内投与により、血圧は高いままであったが、Ang II 持続負荷による血管壁 ROS 産生亢進、内皮依存性血管拡張障害は有意に回復することが示された (本文 Fig 16)(本文 Fig 17)。スルフォラファンによる血管内皮機能の改善効果が示され、これは抗酸化作用を介することが示唆された。

以上の動物実験の結果からスルフォラファンが *in vivo* で有意な血管保護作用を有すると考え、続いて培養ヒト大動脈血管内皮細胞(HAEC)を用いた *in vitro* 実験でスルフォラファンの抗酸化作用、抗炎症作用を確認した。

### 4) 培養ヒト大動脈血管内皮細胞(HAEC)を用いた実験

培養細胞にスルフォラファンを添加することで抗酸化酵素 HO-1 が誘導されることが知られているが、ここでは HAEC にスルフォラファンを添加し HO-1 の mRNA 発現を時系列的に確認した。10  $\mu$  M のスルフォラファン添加後 4 時間で HO-1 の mRNA 発現はピークを迎え、8 時間以降は低下傾向をみるものの添加後 24 時間の時点でも発現亢進は持続していた (Fig. 19)。これをふまえ、以後の *in vitro* 実験はスルフォラファンを 4 時間前に添加してその効果を評価することとした。

培養血管内皮細胞に  $\text{TNF}\alpha$  を添加することで VCAM1, ICAM1 などの細胞接着因子や MCP-1 などケモカインの産生が亢進することが報告されている。今回の実験でも HAEC に  $\text{TNF}\alpha$  添加を行ったところ、VCAM1, ICAM1, MCP-1 の mRNA 発現レベル亢進が確認された。スルフォラファンを 4 時間前に前添加することで、 $\text{TNF}\alpha$  添加によるこれらの分子の発現亢進が有意に抑制された (Fig. 20)。スルフォラファンの血管保護作用にはその抗炎症作用が関与していることが示唆される。このスルフォラファンによる抑制効果は濃度依存性であることも確認された (Fig 21)。

以上まとめると、スルフォラファンは動脈硬化を抑制すること、血管傷害後の再狭窄反応を改善すること、Ang II による活性酸素発生を抑え血管機能障害を改善させることを *in vivo* モデルで示した。さらに培養血管内皮細胞を用いてスルフォラファンの抗酸化作用、抗炎症作用を確認した。

## 5. 考察

心血管疾患は酸化ストレスや炎症による血管内皮障害および動脈硬化性プラークの形成に起因する。本研究では、これまでおもに癌予防・治療の分野で抗酸化作用や抗炎症作用が明らかになっているスルフォラファンを用いて、その血管保護作用を検証した。その結果、スルフォラファンの経口摂取はマウス動脈硬化モデルのプラーク形成を抑制することが示された。また、スルフォラファン投与がラット頸動脈傷害後の新生内膜増生を抑制すること、Ang II 持続負荷による高血圧ラットモデルでもスルフォラファン投与は内皮依存性血管拡張障害を改善することを明らかにできた。Ang II によって惹起される活性酸素を

スルフォラファンが抑制するというデータから、スルフォラファンの血管保護作用はその抗酸化作用を介している可能性が高い。培養ヒト血管内皮細胞ではスルフォラファン添加により抗酸化酵素 HO-1 発現が誘導され、一方、炎症性接着分子発現もスルフォラファン濃度依存的に抑制されることを示すことができた。このように血管細胞においてもスルフォラファンは抗酸化作用および抗炎症作用を有すると考えられる。スルフォラファンが細胞保護的に作用することはこれまでも報告されているが、本研究はスルフォラファンが血管内皮機能改善や動脈硬化抑制を有することを明らかにした最初の研究である。また、本研究プロトコールで用いたマウスでのスルフォラファン経口投与量はヒトに換算すると体重 60 kg あたり 1 日約 200 mg の経口摂取に相当し、臨床応用に決して無理のない量と言える。既に我々が摂取している植物由来の物質であるため安全性も高いことが予想され、実際に海外で行われた健常者を対象とした phase I 試験ではプラセボと比較して有害事象の差は認められていない。心血管疾患の予防および治療に対してスルフォラファンが有効であることを示した研究として、本研究は極めて重要と考える。