

## 論文内容要旨

報告番号	甲栄第 284 号	氏名	河井(近藤) あかり
題目	<b>Suppressive effects of quercetin on hydrogen peroxide-induced caveolin-1 phosphorylation in endothelial cells</b> (血管内皮細胞における過酸化水素誘導のカベオリン-1リン酸化に対するケルセチンの抑制効果)		
<p>血管内皮細胞の細胞膜には、エンドサイトーシスやシグナル伝達を行うプラットフォームである caveolae が豊富に存在する。caveolae を構成する主要なタンパク質である caveolin-1 (Cav-1) は、リポタンパク質の輸送や血管炎症のメディエーターとして作用することで、動脈硬化症の進展に関与すると考えられている。さらに、Cav-1 のリン酸化は血清アルブミンの取り込みを促進する働きがあり、酸化ストレスによる血管透過性の亢進に関与することが報告されている。</p> <p>ケルセチン (Q) は、野菜や果物など日常的に摂取する食品中に広範にわたり含まれるフラボノイドである。食品中では水酸基の一部に糖が結合した配糖体として存在しているが、吸収と同時にあるいは肝臓に到達した後にグルクロン酸抱合化や O-メチル化され、血中ではほとんどが抱合体として存在する。体内の炎症部位では脱抱合されて Q アグリコンとしても存在することが知られている。私たちはこれまでに、酸化 LDL による Cav-1 発現の増加に対する Q アグリコンやその代謝物 quercetin 3-O-<math>\beta</math>-glucuronide (Q3GA) の効果を検討し、血管内皮細胞での Q および Q3GA による Cav-1 発現の抑制効果を確認した (Kamada <i>et al. Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition</i> 2016, 58: 193-201)。</p> <p>本研究は、ヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) を用い、酸化ストレス誘導性 Cav-1 のリン酸化を介した血管内皮障害に対する Q の効果について検討した。</p> <p>酸化ストレスモデルとして過酸化水素を使用した。HUVEC に 2 mM の過酸化水素と、ホスファターゼ活性阻害剤であるオルトバナジン酸を添加して 0.5 時間刺激することにより、Cav-1 のリン酸化を確認した。これに対し、Q および Q3GA を 24 時間プレトリートメントしたところ、Q のプレトリートメントは有意に Cav-1 のリン酸化を抑制した。この時、Cav-1 の発現には影響がなかった。また、Cav-1 のリン酸化反応に関与することが知られている Src ファミリーキナーゼの Fyn について、この過酸化水素刺激の条件によりリン酸化されることが分かった。一方、Fyn のリン酸化は Q の 24 時間プレトリートメントにより抑制されなかった。続いて、Q の構造類縁体 (8-プレニルケルセチン、ルテオリン、ミリセチン、フラボン) による効果を検討した。それぞれ 24 時間プレトリートメントしたところ、過酸化水素誘導の Cav-1 リン酸化に対して抑制効果は見られなかった。さらに、過酸化水素刺激による血管透過性と細胞間結合タンパク質 (VE-cadherin, occluding, JAM, ZO-1) 発現への影響を検討した。0.5 時間の過酸化水素処理により有意に血管透過性亢進を確認した。そして、1、3 時間の過酸化水素処理により VE-cadherin の遺伝子発現が有意に低下した。この血管透過性の亢進と VE-cadherin 遺伝子発現低下は、Q の 24 時間プレトリートメントにより有意に抑制された。</p> <p>以上の結果より、血管内皮細胞が過酸化水素の刺激を受けると、血管内皮細胞の細胞膜に存在する Cav-1 がリン酸化し、VE-cadherin の発現低下に伴い血管透過性が亢進することが示唆された。これに対して、Q は Cav-1 リン酸化を抑制し、VE-cadherin の発現を上昇して血管透過性亢進を阻害したが、Q3GA には同様の効果が無かった。このことより、Cav-1 リン酸化抑制を果たすためには炎症部位での脱抱合反応が必須であることが推察された。本研究の結果より、Q は血管内皮細胞における Cav-1 リン酸化を抑制することで血管内皮障害を予防する可能性が明らかとなった。</p>			

報告番号	甲 栄 第 284 号	氏名	河井 (近藤) あかり
審査委員	主査 竹谷 豊 副査 二川 健 副査 馬渡 一論		
題目	Suppressive effects of quercetin on hydrogen peroxide-induced caveolin-1 phosphorylation in endothelial cells (血管内皮細胞における過酸化水素誘導のカベオリン-1リン酸化に対するケルセチンの抑制効果)		
著者	Akari Kondo-Kawai, Tohru Sakai, Junji Terao, and Rie Mukai 2020年12月19日 Journal of Clinical Biochemistry and Nutritionに受理済		
要旨	<p>カベオラは、血管内皮細胞の細胞膜に豊富に存在する直径 50-100 nm のフラスコ状の陥入で、様々なエンドサイトーシスやシグナル伝達を行うプラットフォームとして機能している。Caveolin-1 (Cav-1) は、カベオラを構成する主要なタンパク質であり、酸化ストレスによりリン酸化修飾を受け、血管内皮細胞の細胞間結合タンパク質の機能障害を誘発することで、血管透過性亢進のプロセスに関連すると考えられている。血管内皮細胞の機能維持にはタマネギに含まれるケルセチンの抗酸化性が有効であるとの報告が多数なされている。さらに、ケルセチンは、Cav-1 の発現も抑制すると報告されている。しかしながら、そのリン酸化に及ぼす抑制効果は未解明であった。そこで、本研究はヒト臍帯静脈内皮細胞 を用いて、2 mM 過酸化水素の 30 分処理で誘導される Cav-1 リン酸化に対するケルセチンの抑制効果について検討を行った。ケルセチンは 24 時間前処理することで、過酸化水素誘導の Cav-1 リン酸化を抑制した。一方で、ケルセチンの抱合代謝物であるケルセチン 3-O<math>\beta</math>-グルクロニド や、ケルセチンの構造類縁体であるルテオリン、ミリセチン、フラボンではこの効果を認めなかった。次に、過酸化水素を処理することで亢進する血管透過性についてコラーゲンコートした半透過性膜上にモノレイヤーを形成したヒト臍帯静脈内皮細胞における FITC 標識デキストラン透過量を測定する方法で評価したところ、ケルセチンは抑制効果を示した。さらに、細胞間結合タンパク質の発現量に対する効果を定量的 RT-PCR で確認した。過酸化水素の処理によって vascular endothelial-cadherin の mRNA 発現減少が確認され、これに対してケルセチンの 24 時間前処理によってその減少が抑制された。以上の結果より、ケルセチンは酸化ストレスによる Cav-1 のリン酸化を抑制することおよび血管透過性亢進を改善することを示した。</p> <p>本研究は、過酸化水素により誘導される Cav-1 のリン酸化に対するケルセチンの抑制効果を明らかにしたものであり、ケルセチンの血管保護作用として新しい知見を与えるものであると考えられ、博士 (栄養学) の学位授与に値するものと判定した。</p>		