

赤ワイン成分レスベラトロールおよびその2量体の
血管内皮細胞に対する保護作用に関する研究

2020年3月

伍哲緯

赤ワイン成分レスベラトロールおよびその2量体の
血管内皮細胞に対する保護作用に関する研究

筑波大学 大学院
生命環境科学研究科
博士（農学）学位論文
伍哲緯

目次

目次	1
要約	2
略語	4
第1章 緒言	6
1-1 研究背景	7
1-2 目的	7
1-3 概要	8
第2章 文献研究	10
2-1 メタボリック症候群の現状	11
2-2 動脈硬化発症・進展における血管内皮細胞の関与	11
2-3 赤ワインポリフェノールと動脈硬化	12
2-4 レスベラトロールと長寿遺伝子サーチュイン 1	13
2-5 ϵ -ビニフェリンと δ -ビニフェリン	14
2-6 HO-1 の機能と赤ワインポリフェノール	15
2-7 血管による NO 産生と CVD 予防	16
2-8 血管における細胞接着因子と炎症反応	18
2-9 まとめ	19
第3章 赤ワイン成分レスベラトロール、 ϵ -ビニフェリン、および δ -ビニフェリンの機能性比較研究	25
3-1 背景	26
3-2 目的	27
3-3 実験材料と方法	27
3-4 結果	32
3-4-1 内皮細胞における創傷治癒の促進およびその経路	32
3-4-2 内皮細胞への抗酸化能力の付与	35
3-4-3 内皮細胞の細胞接着因子の発現への影響	36
3-5 考察	38
3-6 結論	42
第4章 総合討論	62
4 総合討論	63
謝辞	64
引用文献	65

要約

本論文では、赤ワインに含まれるポリフェノール的一种レスベラトロールおよびその二量体である ϵ -ビニフェリンと δ -ビニフェリンに着目し、動脈硬化の発症・進展の抑制効果に繋がる血管内皮細胞の保護効果について比較研究を行った。その結果、これら3種の化合物はすべて血管内皮細胞に対して創傷治癒を促進すると共に、酸化ストレスによる細胞死を抑制する能力を示した。さらに、少なくとも創傷治癒効果に関しては、3種の化合物間でその強さと濃度依存性に違いがあることも明らかとなった。

動脈は外膜、中膜、内膜の3層構造をとり、血液に接する内膜は一層の内皮細胞から構成される。肥満、高血糖、高血圧などのメタボリック症候群は、この内皮細胞に酸化ストレス等による障害をもたらし、それが動脈硬化の引き金となる。したがって、傷害を負った内膜を治癒する能力、即ち内皮細胞に増殖能や遊走能を付与できる化合物、あるいは内皮細胞に酸化ストレス抵抗性を付与できる化合物は、動脈硬化の発症・進展を抑制できると考えられる。私が所属する研究室では、過去にレスベラトロールとその二量体 ϵ -ビニフェリンが、内皮細胞の創傷治癒を促進すると同時に、酸化ストレス抵抗性を付与できることを明らかにした。その際、 ϵ -ビニフェリンがレスベラトロールと比較してより低濃度で効果を示し、かつ効力も強いことを明らかにしている。しかし、そのメカニズムの詳細は不明であり、また同じくレスベラトロールの二量体である δ -ビニフェリンの血管への作用は過去に1報論文があるのみで、内皮細胞に対する創傷治癒や酸化ストレス抵抗性付与に関する報告は存在しない。

本論文では具体的に以下のことを明らかにした。1) レスベラトロールは $10\ \mu\text{M}$ と $20\ \mu\text{M}$ で有意に創傷治癒効果を示したものの、 $5\ \mu\text{M}$ では効果がなかった。これに対し、 ϵ -ビニフェリンと δ -ビニフェリンは $5\ \mu\text{M}$ でも創傷治癒効果を持ち、3種の化合物の中では ϵ -ビニフェリンが最も強い効果を示した。2) 内皮細胞の創傷治癒は一酸化窒素 (NO) の産生に依存することが知られており、3種の化合物もすべて NO 産生能を有したが、1) の結果を反映するように、その作用は ϵ -ビニフェリンが他の化合物より強かった。また、3種の化合物による NO 産生は内皮型 NO 産生酵素 (eNOS) の阻害剤 L-NAME によりほぼ完全に抑制された。これは3種の化合物の創傷治癒効果に、eNOS 活性化を介した NO 産生が不可欠であることを示している。3) レスベラトロールは長寿遺伝子 SIRT1 の発現増加やそのタンパク産物の活性化に関わるが、レスベラトロールだけでなく他の2つの化合物も SIRT1 の発現増加作用を示した。

また、3種の化合物はいずれも、抗酸化酵素ヘムオキシゲナーゼ-1 (HO-1) のタンパク発現を増加させた。4) 3種の化合物それぞれによる創傷治癒作用は、SIRT1の阻害剤EX527およびHO-1阻害剤ZnPPiXにより抑制された。これは、これら3種の化合物による創傷治癒効果にSIRT1とHO-1の両方が必要であることを示唆している。5) 内皮細胞を24時間3種の化合物それぞれと培養し、その後、化合物を洗浄により除去した後、酸化ストレスとして過酸化水素を添加したところ、過酸化水素による細胞死が有意に抑制された。これは、3種の化合物が内皮細胞に対して酸化ストレス抵抗性を付与できることを意味している。6) 3種の化合物は、抗酸化酵素カタラーゼのタンパク発現を時間依存性は異なるものの、いずれも有意に増加させた。

以上の結果より、赤ワイン成分レスベラトロールおよびその二量体ε-ビニフェリンとδ-ビニフェリンは、動脈硬化の発症・進展の抑制効果に繋がる血管内皮細胞の保護効果、即ち創傷治癒効果と酸化ストレス抵抗性付与効果を示すことが明らかとなった。また、効果の強さと濃度依存性に関しては、化合物間で異なることも示された。赤ワインの成分としてはレスベラトロールの作用が注目されているが、本論文は、二量体の効果も重視する必要があることを示すものである。

略語

AMPK	5'-Adenosine monophosphate-activated protein kinase
Ang II	Angiotensin II
ApoE	Apolipoprotein E
ARE/EpER	Antioxidant/electrophile response elements
Bax	BCL2 associated X
Bcl-2	B-cell lymphoma-2
BSA	Bovine serum albumin
CaM	Calmodulin
CAT	Catalase
cGMP	3', 5'-Cyclic guanosine monophosphate
CHD	Coronary heart disease
CO	Carbon monoxide
CORM-2	Carbon monoxide-releasing molecule-2
CVD	Cardiovascular disease
DAF-2DA	Diaminofluorescein-2 diacetate
DCFH-DA	Dichlorodihydrofluorescein diacetate
DEPC	Diethyl pyrocarbonate
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium
EC	Endothelial cell
eNOS	Endothelial nitric oxide synthase
EX527	6-Chloro-2,3,4,9-tetrahydro-1H-carbazole-1-carboxamide
FBS	Fetal bovine serum
FOXO	Forkhead box O
GPx	Glutathione peroxidase
GST	Glutathione S-transferase
H ₂ O ₂	Hydrogen peroxide
HBSS	Hank's balanced salt solution
HO-1	Heme oxygenase-1
HRP	Horseradish peroxidase
ICAM-1	Intercellular adhesion molecule-1
IκB	Inhibitor of kappa B
iNOS	Inducible nitric oxide synthase (NOS)
IL-1β	Interleukin-1β
KEAP-1	Kelch-like ECH-associated protein 1
L-NAME	N-omega-nitro-L-arginine methyl ester hydrochloride
LDL	Low-density lipoprotein

LPS	Lipopolysaccharide
LY294002	2-(4-Morpholinyl)-8-phenyl-1(4H)-benzopyran-4-one hydrochloride
MCP-1	Monocyte chemoattractant protein-1
MnSOD	Mn-superoxide dismutase
NF- κ B	Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
nNOS	Neuronal nitric oxide synthase
NOX	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) oxidase
NO	Nitric oxide
NQO-1	NAD(P)H quinone dehydrogenase-1
NRF-2	Nuclear factor erythroid 2-related factor-2
p53	Tumor protein p53
PDGF	Platelet-derived growth factor
PGC-1 α	Peroxisome proliferator-activated receptor- γ coactivator-1 α
ROS	Reactive oxygen species
Ser	Serine
sGC	Soluble guanylyl cyclase
SIRT1	Sirtuin-1
SIRT3	Sirtuin-3
SOD	Superoxide dismutase
TBS-T	Tris-buffered saline-tween
Thr	Threonine
TNF- α	Tumor necrosis factor-alpha
Tyr	Tyrosine
VCAM-1	Vascular cell adhesion molecule-1
VSMC	Vascular smooth muscle cells
WHO	World health organization
ZnPPXI	Zinc protoporphyrin IX

第 1 章

緒言

1-1 研究背景

植物が産生するポリフェノール類は、植物の味、機能、色、あるいは生理機能と密接に関係している^{1,2}。ポリフェノールは植物の皮や種子に多く含まれ、植物自身の防衛機能を担っている^{1,2}。90年代以降、植物ポリフェノールとその二次代謝産物には人体に対して優れた機能と生理活性があることが認められ、機能性食品として位置付けられるようになった³。ダイズ、お茶、コーヒー豆、ココア、オリーブ、柑橘類、ブドウなどがポリフェノールを多く含有する食品として知られている⁴。人体に対して、ポリフェノールは抗酸化作用を介して、抗糖尿病^{5,6}、抗炎症^{7,8}、抗老化⁹、抗高血圧^{10,11}、コレステロールの減少¹²、肝臓保護¹³、心血管保護¹⁴など多岐にわたる機能性を示すことが研究によって実証されている。

ポリフェノールの研究が盛んに行われるようになったきっかけの一つに、フレンチ・パラドックスがある。フレンチ・パラドックスは1992年にフランスの研究者ルノーが提唱した仮説である¹⁵。フランスは他の西欧諸国に比べて喫煙率が高い。さらに、飽和脂肪酸が豊富に含まれる肉の消費量は世界トップクラスであるにも関わらず、心臓病による死亡率が低い¹⁶。この矛盾は当時の医学理論では説明できないため、科学者はこれをフレンチ・パラドックスと呼んだ。フレンチ・パラドックスを解明するカギとなったのが、フランス人が日常的に摂取しているワインである。フランス人は毎日20~30gのアルコールを摂取している。中でも総アルコール消費量の57%はワインであり、一人当たり年間67リットルものワインを摂取している¹⁵。Fig.1-1に示すように、心疾患死亡率と乳脂肪消費量をワインの消費量で補正すると心疾患死亡率とワインとの関連性が見えてくる¹⁷。乳脂肪とワインの消費量が高いほど、心疾患死亡率が低くなるというものである。また、疫学研究によって毎日30~50gのアルコールを摂取すると心血管疾患（Cardiovascular disease: CVD）発症のリスクが減少する^{18,19}。さらに、種々の酒類の中でも赤ワインはCVDに対する効果が特に顕著であることが証明された¹⁹。研究者らは赤ワインの中に多く含まれるポリフェノールの機能がこの結果の要因であると考え²⁰、これがフレンチ・パラドックスを引き起こすメカニズムであると考えた^{21,22}。赤ワインポリフェノールの機能性は心血管に対して特に注目され、生活習慣病による動脈硬化への予防効果が期待されている。

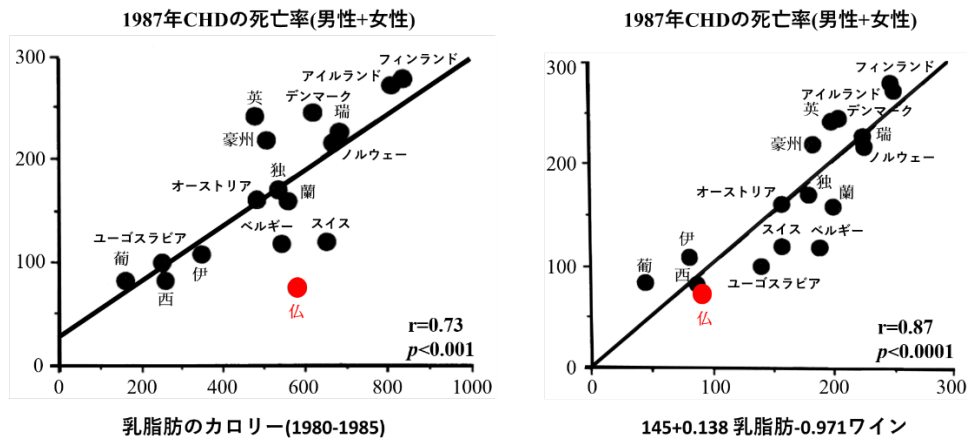
1-2 目的

本研究の目的は、赤ワインに含まれるポリフェノールの一種レスベラトロールおよびその二量体 ϵ -ビニフェリンと δ -ビニフェリンに着目し、動脈硬化の発症・進展の抑制に繋がる血管内皮細胞の保護効果について、効果の強さと濃度依存性、作用機序に関し比較することである。具体的には、創傷治癒の促進、抗酸化酵素の発現促進、接着因子の発現抑制などについて比較検討した。

1-3 概要

第2章では、研究の背景となる論文、具体的に検討する因子に関する論文など、上記の研究目的のための実験に必要な文献研究を行った。具体的には、動脈硬化に繋がるメタボリック症候群の現状、動脈硬化発症・進展における血管内皮細胞の関与、赤ワインポリフェノールによる動脈硬化抑制、レスベラトロールと長寿遺伝子 Sirtuin-1 (SIRT1) との関係について、文献検索により研究遂行の土台作りを行った。

第3章では、第2章を踏まえ、実際の実験を行い、その結果を示すと共に考察を加えた。具体的には、レスベラトロール、 ϵ -ビニフェリンおよび δ -ビニフェリンが血管内皮細胞の創傷治癒に与える影響、これら3種の化合物が血管内皮細胞の創傷治癒と密接に関わるNO産生に与える影響、3種の化合物の創傷治癒促進の作用機序を知るための内皮型NO産生酵素 (Endothelial nitric oxide synthase: eNOS)、SIRT1、Heme oxygenase-1 (HO-1)、AKT、5'-Adenosine monophosphate-activated protein kinase (AMPK) などの細胞内因子の解析、3種の化合物の血管内皮細胞に対する酸化ストレス抵抗性の付与、それに関連する細胞内活性酸素種 (ROS) 濃度の減少、抗酸化酵素カタラーゼの発現促進、過酸化水素による接着因子 Vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) と E-selectin の発現増加の抑制と Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells (NF- κ B) 活性化の抑制に関する実験を行った。



(Renaud & de Lorgeril: Lancet. 338, 1992 より作成)

Fig. 1-1 心疾患死亡率と乳脂肪消費量

乳脂肪摂取量と冠動脈心疾患 (Coronary heart disease: CHD) による 10 万人当たりの死亡率 (左図) と、乳脂肪摂取量をワイン消費量で補正した値と CHD による死亡率 (右図)。左図ではフランスの値は相関から大きく外れているが、ワイン摂取量で補正した右図では、ワイン摂取量と CHD の間に逆相関が見られ、フレンチ・パラドックスを支持するデータとなっている¹⁵。

第 2 章

文献研究

2-1 メタボリック症候群の現状

生活習慣病は、1988年にリーヴンによってシンドローム X という概念として提唱された、生活習慣と深く関与している糖尿病や脂質異常症、高血圧、高尿酸血症等の疾患の総称である²³。1998年、世界保健機関（WHO）によってこれらの症状はメタボリック症候群と呼ばれ、その判断の基準も発表された²⁴。アメリカでは、メタボリック症候群の男性と女性の有病率はそれぞれ 22.8%と 22.6%であった²⁵。また、年齢によっても有病率は異っていた。20代の有病率は 6.7%、60代の有病率は 43.5%、70代以上の有病率は 42%であり²⁶、ヨーロッパにおいては、フランスでの 30代の有病率は 5.6%、60代の有病率は 17.5%であった²⁷。また、閉経後の女性の有病率は男性の倍以上に達していた²⁵⁻²⁷。日本においては、2006年の研究によると、メタボリック症候群の有病率は 40代の男性は 13.3%、70代になると有病率は 18.9%へ上昇し、40代の女性の有病率は 1.5%、70代の有病率は 4.8%であった。アメリカやヨーロッパと違い、男性の有病率が女性の 3 倍以上である²⁸。

メタボリック症候群患者の一部は肥満によるインスリン抵抗性を示し、2型糖尿病などの病態を経て、最終的に死亡率が高い CVD に至る^{23,24}。特にメタボリック症候群は動脈硬化の発症と深く関わっており、糖尿病による酸化ストレス、脂質異常症における低密度リポタンパク質（Low-density lipoprotein: LDL）の酸化、高血圧による動脈へのシェアストレスなどの危険因子が積み重なった結果、やがて動脈硬化を引き起こすことが明らかとなった^{24,29-31}。

2-2 動脈硬化発症・進展における血管内皮細胞の関与

動脈硬化はメタボリック症候群により引き起こされる疾患の 1 つであり、発症までにいくつかの過程を経る。血管の構造（Fig.2-1）は外膜、血管平滑筋細胞（VSMC）からなる中膜、そして一層の内皮細胞（EC）からなる内膜によって構成されている³²。動脈硬化の発症メカニズムの第一段階として、血管内皮

細胞が ROS、酸化 LDL あるいは炎症性サイトカインによって刺激され、障害が引き起こされる。第二段階では、内皮細胞の ICAM-1、VCAM-1 と E-selectin、P-selectin などの接着因子の発現が亢進し、血液中の単球やリンパ球が傷害部に接着する³³。第三段階では、これら血球細胞が内皮細胞下に浸潤しマクロファージに分化後、血中コレステロールを貪食し最終的に血管内にアテロームが形成される (Fig.2-2)。ここまで進展すると血管は柔らかさを失い、さらに内径は狭くなり高血圧症や心肥大を引き起こし、死亡率の高い心筋梗塞や脳梗塞に至る^{33,34}。内皮細胞は血管の最内層の細胞であり、血圧の変化や免疫反応により影響される。内皮細胞には eNOS という、NO の合成に関与する酵素が存在する。NO は血圧の調節、血小板凝集作用、その他内皮細胞の種々の機能に関与する³⁵。肥満、高血圧症、高脂血症、糖尿病は代表的な生活習慣病であり、体内に酸化ストレスを引き起こす。これにより NO 産生は抑えられ、EC の修復と再生ができなくなると血管は動脈硬化へと進む³⁶。

2-3 赤ワインポリフェノールと動脈硬化

赤ワインの適度な摂取には、CVD および他の慢性病状やがんを予防する効果があることが報告されている。これは主に赤ワインに多く含まれるポリフェノールによるものであるとされ、ビールやスピリッツ、さらには白ワインなどにはない機能性と言える^{19,20}。赤ワインに含まれる高濃度で多種多様なポリフェノール化合物の大部分はブドウの皮や種子由来のものである。これらの化合物がワイン特有の苦味や渋み、色を呈する。さらにワインの長い熟成過程において強力な抗酸化作用を発揮するため防腐剤としての働きもある。ブドウの品種や環境要因およびエノロジカルな技術が赤ワインのポリフェノール化合物に影響する。レスベラトロールは 1939 年に北海道帝国大学の高岡道夫が高山自生のユリ科の植物であるバイケイソウから発見し、レゾルシノール構造を有することからレスベラトロールと命名された。1988 年、ブドウの皮にレスベ

ラトロールが存在することが確認され、1992 年にはワイン中においてレスベラトロールが検出された³⁷。レスベラトロールは外的環境のカビやストレス、汚染等から果実を守るファイトアレキシンとして機能しており³⁸、ブドウに UV 照射すると量が増えることが確認されている³⁹。レスベラトロールはブルーベリーの葉や枝、皮、種のほか、ピーナッツの薄皮にも含まれる⁴⁰。赤ワインの機能性はフレンチ・パラドックスのメカニズムと関連していると考えられ、赤ワインの代表的なポリフェノールとしてレスベラトロールの研究が積極的に展開され、レスベラトロールの抗酸化能力が CVD および動脈硬化に対して効果を発揮していると報告された。

CVD に関与するレスベラトロールの機能は Fig.2-3 で示すように、1 つは、抗酸化酵素である Superoxide dismutase (SOD) や Glutathione peroxidase (GPx)、カタラーゼの発現や活性を増加させ、ROS を減少させることである⁴¹。これは LDL の酸化を抑制することに繋がる⁴²。レスベラトロールは心血管に対して重要な NO の産生も誘導する。血管系に関与する NO は内皮細胞の eNOS により産生され、内皮細胞の機能を保護し、血管平滑筋を弛緩させ、血管を拡張し血圧を低下させる⁴³。抗酸化酵素の誘導と NO の産生、この 2 つのメカニズムは SIRT1 によって調節されている。

2-4 レスベラトロールと長寿遺伝子 SIRT1

SIRT1 は長寿遺伝子として知られ、サーチュインファミリーの中で最も研究されている遺伝子である。2004 年レスベラトロールと SIRT1 の関連が動物実験で確認された。また、SIRT1 は低栄養にならない程度のカロリー制限によっても誘導される遺伝子である⁴⁴。2006 年、SIRT1 遺伝子はレスベラトロールにより活性化されることが判明した。動物実験において、中年マウスモデルにレスベラトロールを投与すると、高カロリーによって引き起こされるインスリン抵抗性、内臓脂肪の蓄積が AMPK のリン酸化を介して予防され、さらに SIRT1

は PGC-1 α 活性化を促し、ミトコンドリアバイオジェニクスへの誘導、エネルギーの消費と運動機能を活発にすることが報告された⁴⁵。心血管系に関しては、SIRT1 の過剰発現が Apo E (-/-) マウスの動脈硬化の進展を抑えることが示された⁴⁶。内皮細胞に対して、SIRT1 は eNOS を活性化し、NO や抗酸化酵素 SOD やカタラーゼの発現を誘導し、NADPH オキシダーゼ (NOX) および ROS の産生を抑制する^{47,48}。また、Fig.2-4 に示すように、SIRT1 は炎症に関与する転写因子 NF- κ B の活性を阻害し、細胞接着因子 ICAM-1、VCAM-1、および E-セレクトインの発現を抑える⁴⁹⁻⁵¹。これらの機能は、SIRT1 遺伝子が内皮細胞や心血管系に対して働きかける重要な保護メカニズムと言える。

2-5 ϵ -ビニフェリンと δ -ビニフェリン

ϵ -ビニフェリンと δ -ビニフェリンは、1977 年にラングケーキとプライスがブドウから発見した、赤ワインポリフェノールの 1 つであるレスベラトロールの脱水二量体である^{52,53}。いずれもレスベラトロールと同じく赤ワインのポリフェノールとして知られている。

ϵ -ビニフェリンと δ -ビニフェリンはブドウの皮に多く、ブドウの皮は太陽光や真菌、微生物等による種々の環境ストレス刺激からブドウを守るために、多くの抗酸化物質を産生する。ブラジルの赤ワインは生産時に、ブドウの皮や種と一緒に潰して発酵するため、より多くのビニフェリンを得られる⁵⁴。現在では、 ϵ -ビニフェリンと δ -ビニフェリンはレスベラトロールの酸化脱水素反応によって生産可能である⁵⁵。 ϵ -ビニフェリンは細胞内の抗酸化酵素と NO の誘導能があり、血管平滑筋細胞では Akt-p38、Nrf2-HO-1 の経路を介して iNOS の発現を誘導し⁵⁶、内皮細胞では eNOS 活性化と抗酸化酵素カタラーゼや GPx を誘導し、自然発症高血圧ラットを用いた動物実験においては降圧作用を示した¹¹。また、3T3-L1 と肥満モデル動物実験では抗肥満と抗炎症の機能が確認され、健康食品として販売されている⁵⁷。さらに、 ϵ -ビニフェリンは血液脳関門を通

過できるため、アストロサイトとグリア細胞の炎症反応を抑えることによるアルツハイマー病の改善効果や、SIRT3 を介した抗酸化酵素 Mn-SOD の活性化により ROS 産生を抑えることで神経細胞を保護し、ハンチントン病の発症リスクを低減することも知られている^{58,59}。δ-ビニフェリンはレスベラトロールやε-ビニフェリンに比べ圧倒的に研究が遅れているが、その構造から抗酸化機能を持つだろうと考えられている。細胞実験において、高グルコースによる ROS 産生に対し、抗酸化酵素カタラーゼを誘導するとともに、SIRT1 を介して p53 と BCL2 associated X (Bax) を抑制、B-cell lymphoma-2 (Bcl-2) を活性化し、細胞のアポトーシスを抑制するとの報告がある^{60,61}。

2-6 HO-1 の機能と赤ワインポリフェノール

HO-1 はヘム分解を担う律速酵素 Heme oxygenase の 1 つであり、生体においてヘムを分解して、一酸化炭素 (CO) 鉄イオン (Fe^{2+}) とビリベルジンを生成する⁶²。HO-1 は Heme oxygenase のアイソフォームであり、種々のストレスおよびインスリン様成長因子により誘導される^{62,63}。定常状態では、細胞質に存在する転写因子 Nuclear factor erythroid 2-related factor-2 (Nrf2) は Keap-1 と結合しユビキチン化によりプロテアソームによって分解され、その存在量は制御されている。ストレスを受けた時に Keap-1 が親電子性物質や活性酸素(窒素)種による酸化修飾を受けると、Keap-1 はユビキチン化が減弱し、Nrf2 が Keap-1 と離れて細胞核へ移行する⁶⁴。核に移行した Nrf2 は抗酸化遺伝子の制御配列の抗酸化剤応答配列 (Antioxidant/electrophile response elements: ARE) と結合し、HO-1、または他の抗酸化遺伝子群を統一的に転写誘導する⁶⁴。ヘムが HO-1 により分解された産物 CO、鉄イオンと Biliverdin は、生体に対して多様な生理機能がある⁶⁵。

HO-1 により生成された CO は血管において Soluble guanylyl cyclase (sGC) を活性化し、3', 5'-Cyclic guanosine monophosphate (cGMP) を増やし、血管拡

張を介して血圧を調節する。また、CO は I κ B の制御を介して、リポ多糖 (Lipopolysaccharide: LPS) による NF- κ B の活性化を抑え、また細胞に対しては、炎症性サイトカインである Tumor necrosis factor- α (TNF- α) および Interleukin-1 β (IL-1 β) の産生を減らし、抗炎症または抗増殖の機能を示す^{66,67}。さらに、CO は内皮細胞で TNF- α により p38 MAPK の活性化を阻害し、抗アポトーシスの作用を持つことが判明している⁶⁸。

HO-1 により生成された鉄イオンはフェリチンに変換される。このフェリチンには細胞保護作用があり⁶⁹、動脈硬化に対して抗炎症性サイトカインの IL-10 を誘導し、抗炎症と抗酸化の効果を示す⁷⁰。

へムから分解された Biliverdin は、Biliverdin 還元酵素により Bilirubin に変換される。Bilirubin は強い抗酸化機能を有する。ヨーロッパの研究により、体内のビリルビン濃度を上昇させると、冠状動脈性心疾患の発症リスクが減少することが報告された^{63,71}。アルツハイマー病、虚血性心血管疾患と虚血再灌流障害のような酸化ストレスに関わる疾患についても、保護作用を有することが証明されている^{72,73}。また、LDL の酸化と活性酸素の制御に介し、動脈硬化を予防する⁷⁴。さらに Angiotensin II (Ang II) による内皮細胞への DNA 損傷を減らし、細胞保護機能を示す⁷⁵。

このように、HO-1 によるへムの分解産物は、多彩な作用と経路を介して (Fig.2-5)、細胞に対する保護作用を有し、動脈硬化と CVD に対する強い予防効果を示す。

2-7 血管による NO 産生と CVD 予防

NO は体内の重要なシグナル伝達因子として機能している。NO は一酸化窒素合成酵素 (NOS) により産生され。NOS は機能により、血管内皮細胞に関連する eNOS、炎症やストレスに関連する誘導型 NOS (iNOS)、神経細胞に関連する神経型 NOS (nNOS) に分類され、その中でも eNOS と iNOS とが血管

機能に深く関わっている⁷⁶。

eNOS は 1980 年に米国の生理学者ファーチゴットにより発現され、血管内皮細胞からの NO 産生を誘導することが明らかとなった。eNOS により産生された NO は血管の弛緩反応を誘導し、血管拡張作用を引き起こす。また血管新生作用と肥満による Insulin 抵抗性の改善ももたらす³⁶。eNOS の活性はカルシウムの濃度に依存しており、カルシウム結合タンパク質の Calmodulin (CaM) と結合すると構造変化を起こし、リン酸化、アセチル化、メチル化およびタンパク質切断などの翻訳後修飾を受ける。eNOS は CaM に結合すると、Ser、Tyr、Thr などの多重サイトがリン酸化される。eNOS のリン酸化部位 Ser1177 は最もよく研究されており⁷⁷、eNOS 活性化の代表的な寄与因子である⁷⁸。

iNOS は常に活性化状態にあり、生体の防御機能に関係する。炎症性サイトカインによりその発現が誘導される。iNOS は eNOS よりも多くの NO を誘導し、過剰発現時に NO がスーパーオキシドと反応すると、毒性の強いラジカルであるペルオキシニトライトを形成する⁷⁹。iNOS の発現は炎症、アポトーシス、心機能障害あるいは癌とも深く関連している^{80,81}。

通常は、血管平滑筋細胞、単球あるいはマクロファージで iNOS が発現し、eNOS と iNOS が産生した NO が、sGC と cGMP の経路より血管弛緩を誘導し⁸²、血管損傷の修復と再生を行う。また血小板由来増殖因子 (PDGF) により血小板凝集と平滑筋細胞増殖を減少させ、血栓形成を抑え、高血圧症、肥大型心筋症およびアテローム性動脈硬化を予防する^{56,82}。

過去の研究により、HO-1 には eNOS と iNOS を活性化させ、NO 産生を誘導する機能があり、AKT を介して eNOS を活性化させ、NO を産生させることが報告されている。レスベラトロールと ε-ビニフェリンが血管平滑筋細胞において HO-1 を誘導し、非ストレス下で HO-1 経路を起動し、NO 産生および抗増殖作用を誘導し、さらに内皮細胞で NO による創傷治癒と抗酸化酵素を誘導するとの報告がある^{11,56}。

2-8 血管における細胞接着因子と炎症反応

動脈硬化の発生進展に炎症は深く関与し、現在では動脈硬化は血管の慢性炎症と考えられている。また、細胞と基質間の接着を担う分子である細胞接着因子が、炎症反応に関わると考えられている。接着因子には多種類のファミリーが存在するが、血管の接着因子は免疫グロブリンスーパーファミリーと Selectin ファミリーに属する。ICAM-1 (CD54) と VCAM-1 (CD106) は免疫グロブリンスーパーファミリーの接着因子であり、Selectin ファミリーとしては、E (CD62E)、L (CD62L)、P (CD62P) の3種の Selectin が知られている⁸³。接着因子の役割は非常に広く、炎症の際は、接着因子が血管内皮細胞の表面に表れ、血管中に循環している単球、リンパ球、好中球を捕捉し、組織への浸潤を促進し、また白血球を活性化し、血管平滑筋細胞の遊走と増殖をもたらして、動脈硬化の初期症状に至る^{83,84}。

NF- κ B は免疫反応において重要な転写因子として働き、ストレスやサイトカイン等の刺激により活性化され、核転移し、細胞の増殖または炎症とアポトーシスなどの数多くの生理現象や症状に関与している。NF- κ B は P65、p50、p52 のヘテロ二量体で構成されるタンパク質複合体である。通常、細胞質中の NF- κ B は I κ B と結合し不活化されている。I κ B は自己のリン酸化により NF- κ B 活性を調節している⁸⁵。Transforming growth factor- α (TGF- α)、IL-1 β または ROS のようなサイトカインとストレスの刺激により I κ B はリン酸化され、ユビキチン化により分解される。I κ B から遊離した NF- κ B の P65 タンパクはリン酸化されることで活性化し、細胞核内に移行する^{85,86}。核移行した NF- κ B は目標の遺伝子のプロモーターに結合して炎症またはアポトーシスへ至るタンパク質の発現を調節する。接着因子 ICAM-1、VCAM-1、E-selectin は NF- κ B の活性化を介し血管の炎症を促進する。従って、NF- κ B の活性を抑えることで早期動脈硬化を予防することができると考えられる^{87,88}。

過去の研究によると、HO-1 と Bilirubin は転写因子 NF- κ B 活性化抑制を介して接着分子 VCAM-1 と E-selectin の発現を抑制する⁸⁹。また SIRT1 も脱アセチル化によるタンパク質の翻訳後修飾機能で NF- κ B 活性化を抑制し、ICAM-1 と VCAM-1 の発現を抑える。ROS は NF- κ B の活性を調節する血管収縮作用と関与する⁴⁹。Ang II は細胞内 H₂O₂ の産生を増やし、I κ B の分離と NF- κ B の活性化を引き起こし、VCAM-1 を発現させる。内皮細胞中の ROS を減少させると NF- κ B は不活性化し、ICAM-1 と VCAM-1 の発現が抑えられる^{50,90}。すなわち、細胞内 ROS を分解することができる SOD や Catalase のような抗酸化酵素が増加すると、粘着因子の発現が減少し、動脈硬化の予防に繋がる⁹⁰⁻⁹²。

2.9 まとめ

赤ワイン中のポリフェノール化合物レスベラトロールは、1992 年から現在までの間、細胞・動物での実験やヒトでの臨床試験を重ねることで様々な機能性とメカニズムが解明されてきたが、長所と同時に欠点も発見された。欠点としては生物利用率が低いことや、ヒトに対して影響が薄く、個体差も大きいことが挙げられ⁹³⁻⁹⁵、フレンチ・パラドックスとの因果関係を考えると、レスベラトロールの効果だけでは説明が不十分とも指摘されていた⁹⁶。そこで我々はレスベラトロールの二量体である ϵ -ビニフェリンと δ -ビニフェリンに注目した。 ϵ -ビニフェリンと δ -ビニフェリンは赤ワイン中に多く含まれ、生物利用率と抗酸化能がレスベラトロールよりも高いことから^{11,56,97}、同じ赤ワインポリフェノールとして、レスベラトロールよりも良好な効果が期待できると考えた。

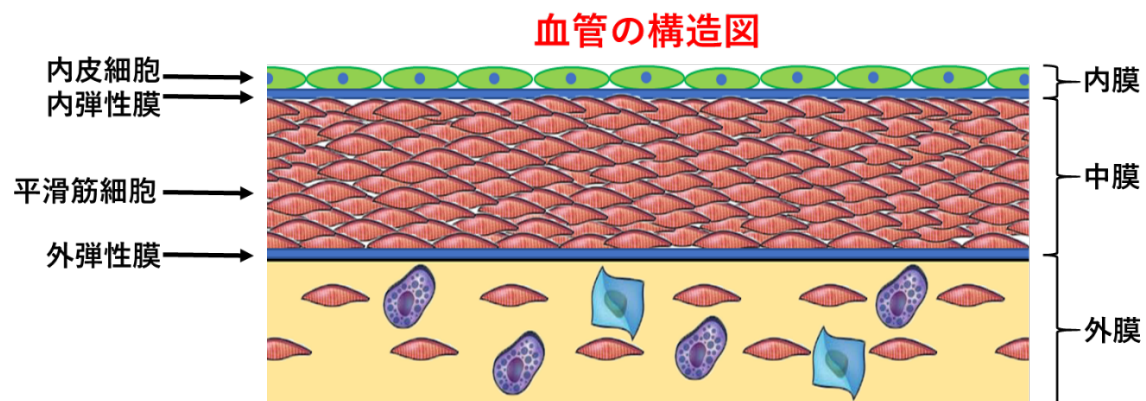


Fig. 2-1 血管の構造図

血管壁は内膜・中膜・外膜の3層構造をとる⁹⁸。

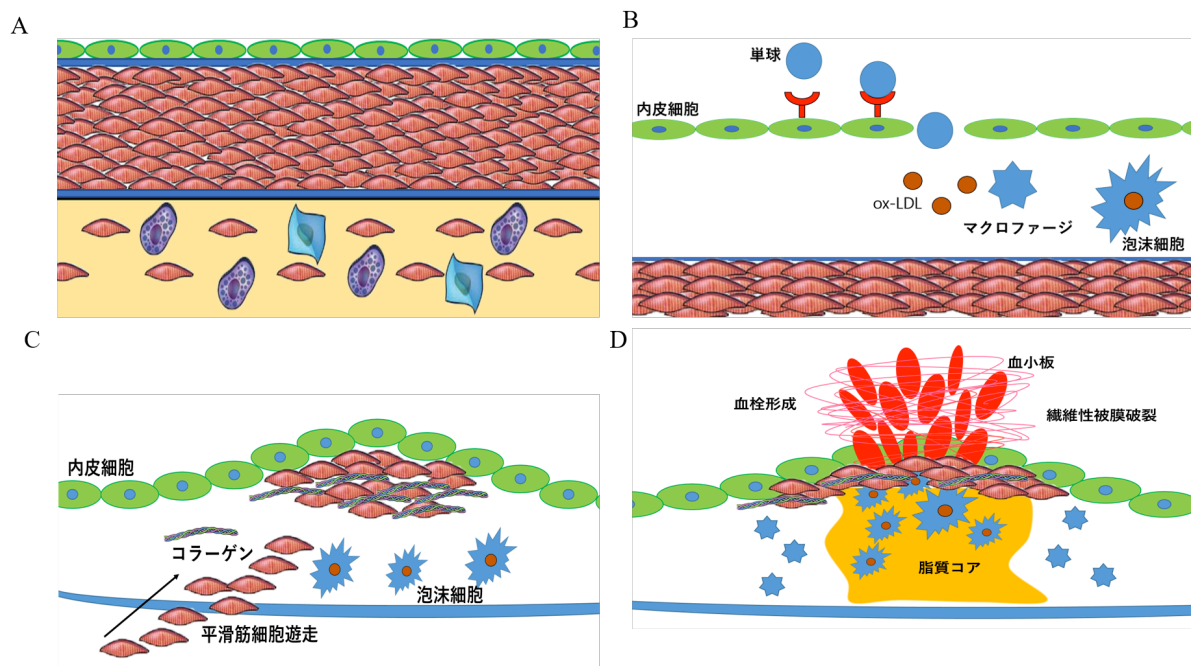


Fig. 2-2 アテローム性動脈硬化発症・進展の概略図

動脈硬化の発症・進展には、炎症が重要な役割を果たしている。Aは正常な動脈を示しており、内膜には内皮細胞が、中膜には主に血管平滑筋細胞が存在している。Bは動脈硬化の発症開始段階を示しており、内皮細胞上の接着因子の発現や炎症により誘導された単球の内膜への侵入が認められる。単球は成熟するとマクロファージとなり、酸化LDLを貪食後、内膜中において泡沫細胞となる。Cはアテローム性プラークへのさらなる進行を示す。血管平滑筋細胞は内膜へ遊走、増殖し、コラーゲンやエラスチン、プロテオグリカン等の細胞外マトリックス分子の産生も促進する。死滅したマクロファージ、泡沫細胞および血管平滑筋細胞は貯蓄していた脂質を放出し、脂質核と呼ばれるプラークの中央領域に蓄積する。Dはプラークが破裂した状態を示しており、血液とプラーク中の組織因子との接触により、血流の妨げとなる血栓が形成される³³。

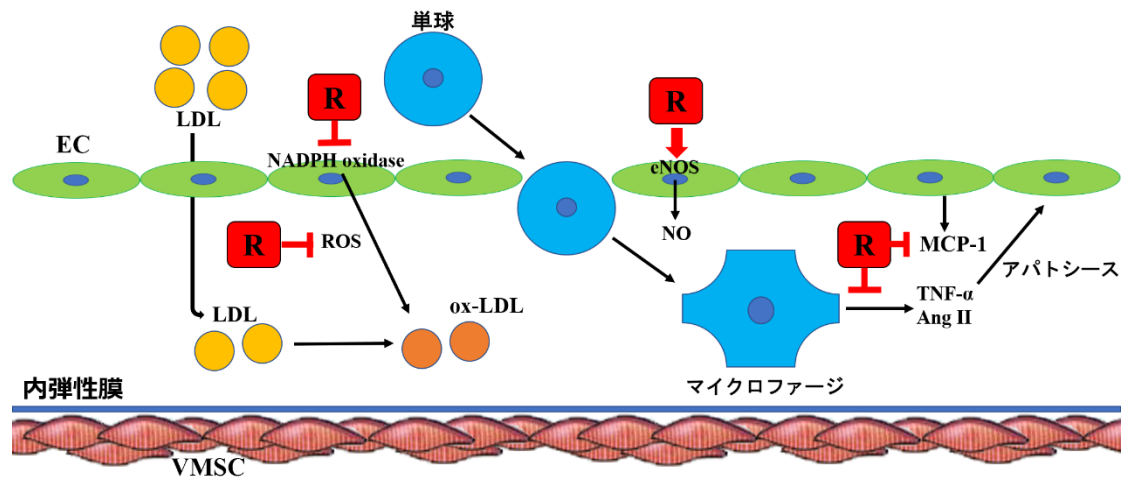


Fig. 2-3 レスベラトロールの動脈硬化への影響

レスベラトロール (R) が血管内で ROS 産生酵素 NOX を抑制し、ROS 産生を減少させると共に、eNOS の発現を促進し、単球走化性促進因子 (Monocyte chemoattractant protein-1: MCP-1) の発現を抑制する。また、TNF- α および Ang II によって引き起こされるアポトーシスを抑制する²¹。

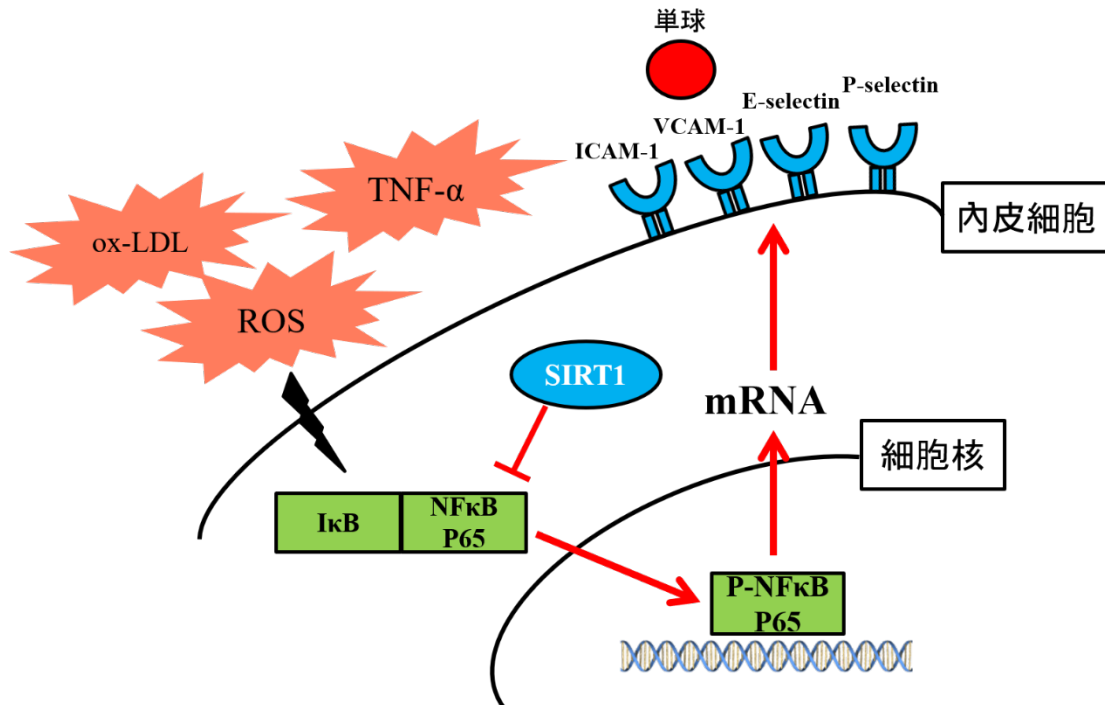


Fig. 2-4 SIRT1 の接着因子への影響

$\text{TNF-}\alpha$ 、酸化 LDL および ROS が内皮細胞に刺激を与え、内皮細胞表面に ICAM-1 や VCAM-1 、 E-selectin および P-selectin のような接着因子が発現する。単球はこれら接着因子により内皮細胞へ結合し、血管内膜へ浸潤する。SIRT1 は $\text{NF-}\kappa\text{B}$ を制御することによって ICAM-1 と VCAM-1 の発現を抑制する⁴⁹。

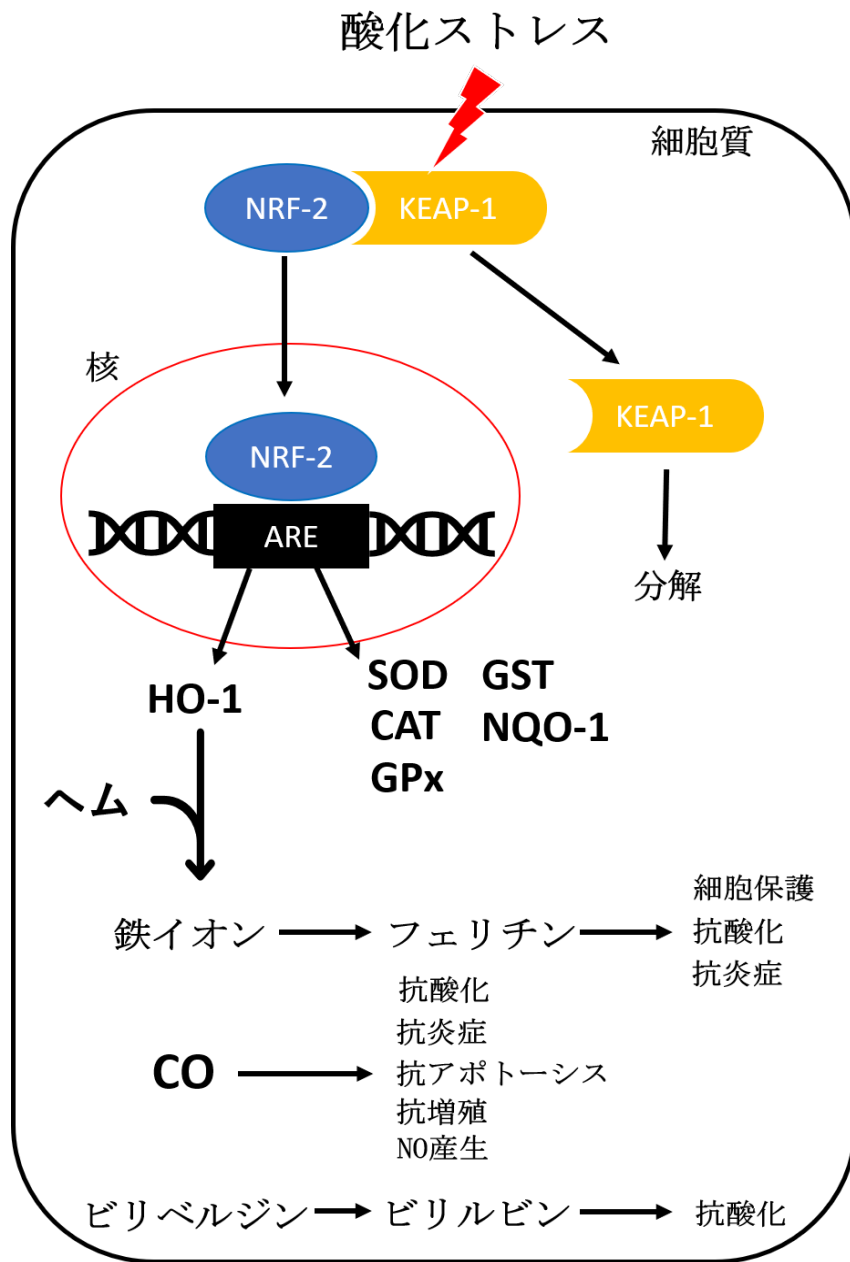


Fig. 2-5 HO-1 の様々な機能

ストレス存在下で HO-1 は NRF-2-ARE の経路により誘導され、ヘムを分解し、CO、鉄イオン、ビリベルジンを生成する⁹⁹。

第3章

赤ワイン成分レスベラトロール、 ϵ -ビニフェリン、および δ -ビニフェリンの機能性比較研究

3-1 背景

赤ワインのポリフェノールには CVD の予防効果があることが報告されている。レスベラトロールは赤ワインポリフェノールの 1 つであり、1992 年から様々な細胞と動物実験による研究が行われてきた。当研究室の先行研究において、レスベラトロールの二量体である ϵ -ビニフェリンが血管平滑筋細胞の遊走・増殖を抑制し、抗酸化酵素の発現を誘導する機能を示すことが明らかとなった⁵⁶。また、内皮細胞の創傷治癒機能の促進、eNOS のリン酸化と NO の産生を促進することも示された¹¹。さらに、動物実験では降圧効果も示されたが、NO 産生促進のメカニズムは未だ明らかになっていない部分が多い¹¹。また、 δ -ビニフェリンに関しては、血管系に対する作用は明らかにされていない。

レスベラトロールの NO 産生機能は、eNOS のリン酸化による活性化を介す¹⁰⁰。eNOS はリン酸化キナーゼ AKT や AMPK の活性によってリン酸化される¹⁰¹。長寿遺伝子 SIRT1 も eNOS のリン酸化を調節する。SIRT1 は脱アセチル化の機能を持ち、この機能を介して細胞中の機能性タンパク質の発現をコントロールすることが明らかとなっている¹⁰²。SIRT1 は eNOS と結合し eNOS を脱アセチル化する。また、AKT や AMPK を介して eNOS を活性化して NO を産生し、創傷治癒を促進する^{101,102}。内皮細胞の機能は、ROS やシェアストレスなどによって抑制される。これらストレスにより炎症に関わる NF- κ B を介して接着因子の発現増加が引き起こされる^{103,104}。NF- κ B は P50 と P65 により構成される二量体であり、不活性な NF- κ B は細胞質に存在する I κ B と結合することにより活性が抑制されている¹⁰⁵。NF- κ B は、過酸化水素、TNF- α 、IL1- β などの刺激による P65 のリン酸化により活性化される^{103,106}。活性化した NF- κ B は核内移行し、DNA 上の κ B モチーフ (GGGACTTCC) と結合し、接着因子の転写活性を誘導する^{104,106}。従って、内皮細胞の機能を保護するうえで、ROS の減少および NF- κ B 活性化の抑制は重要である。

3-2 目的

本研究では、赤ワインに含まれるポリフェノール的一种であるレスベラトロールとその二量体 ϵ -ビニフェリンおよび δ -ビニフェリン (Fig.3-1) に着目し、動脈硬化の発症・進展の抑制にとって重要な血管内皮細胞の保護効果について比較し、その作用機序の一端を明らかにすることを目的とした。

3-3 実験材料と方法

3-3-1. 材料

レスベラトロールは Cayman Chemical Co.から購入した。L-Arginine、2',7'-Dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFH-DA)、 ϵ -ビニフェリンと、N omega-Nitro-L-arginine methyl ester hydrochloride (L-NAME) は富士フィルム和光純薬から購入した。Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)、ウシ胎仔血清 (Fetal bovine serum: FBS)、Penicillin、Streptomycin、Hanks' balanced salt solution (HBSS)、化合物 C、EX527 は Sigma-Aldrich から購入した。Diaminofluorescein-2 diacetate (DAF-2DA) は積水メディカルから購入した。CellTiter 96 Aqueous One Solution Reagent は Promega から購入した。Zinc Protoporphyrin XI (ZnPPXI) は Calbiochem から購入した。 δ -ビニフェリンは筑波大学吉田研究室から譲り受けた。抗体については、SIRT1、Phospho-eNOS3 (Ser1177)、マウスモノクローナル抗 α -チューブリン抗体、抗ウサギ IgG は Santa Cruz Biotechnology から、 α -チューブリンは Calbiochem から購入した。 β -Actin はシグマから、Phospho-AMPK、Phospho-Akt (Ser473)、FOXO3a、Phospho-NF- κ Bp65、Phospho-I κ B は Cell Signaling から購入した。Catalase と HO-1 の抗体はシグマに作製を依頼した。Catalase は ADNRDPASDQMKHWKEQRA の配列を持つペプチドを、HO-1 は PNSMPQDLSEALKEATKE の配列を持つペプチドを抗原として、それぞれウサギを用いて抗体を作製した。

3-3-2. 血管内皮細胞の培養

土浦市の屠畜場よりブタの大動脈を入手し、Phosphate-buffered saline (PBS) で洗浄した後、3%の Penicillin/Streptomycin を含む PBS に 30 分以上浸して滅菌した。大動脈をハサミで切り開き、メスで血管内膜表面の細胞を取り、DMEM に懸濁した。1500 rpm で 5 分間遠心分離した後、細胞培養用ディッシュで培養した。10% FBS、1% Penicillin/Streptomycin、低 Glucose DMEM によって継代し、5% CO₂、37°C で培養した。実験には 7 代から 10 代までの継代数の細胞を使用した。

3-3-3. 創傷治癒実験

3×10^5 個の内皮細胞を 3.5 cm ディッシュに播種し、10% FBS を含む DMEM で 8 時間かけて接着させ、1% FBS の培地に変えて 16 時間培養した後、培地を交換した。次に DMSO で溶解したレスベラトロール、 ϵ -ビニフェリン、 δ -ビニフェリンを添加した。阻害剤処理を行う場合は各化合物添加の 1 時間前に添加した。各化合物の添加後、200 μ L チップ先端でディッシュの底に線を引き、顕微鏡で撮影した。この時点をも 0 時間とした。24 時間後、細胞遊走と増殖の指標として顕微鏡で撮影を行い、線の範囲内に存在する細胞数をカウントすることにより、創傷治癒効果を評価した。

3-3-4. NO 産生量の測定

内皮細胞を 96 ウェルプレートに播種し、10% FBS を含む DMEM で 8 時間かけて接着させ、1% FBS の培地に変えて 16 時間培養した後、HBSS で 2 回洗浄し、10 μ M の DAF-2DA/HBSS を添加して 45 分間培養した。再び HBSS で 2 回洗浄し、100 mM の L-Arginine/HBSS 溶液に 10 μ M のレスベラトロールと ϵ -ビニフェリン、5 μ M の δ -ビニフェリンを添加し、24 時間 NO 産生量を測定した。NO 産生量の測定は ARO MX/Light 1420 Multilabel/Luminescence Counter

(Perkin Elmer® Precisely) を用いて、励起波長 485 nm/吸収波長 535 nm で検出する。

3-3-5. ウェスタンブロット法

内皮細胞を 3.5cm ディッシュに 2×10^5 個で播種し、10% FBS を含む DMEM で 8 時間かけて接着させ、1% FBS の培地に変えて 16 時間培養した後、培地を交換した。これに各化合物を添加してそれぞれの反応時間で回収した。回収する際は PBS (-) で 2 回洗浄し、 -80°C で保存した。その後溶解バッファー (50 mM HEPES pH 7.5、50 mM NaCl、1 mM Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) 、5% Glycerol、100 mM Nafamostat、10 mM Sodium pyrophosphate、1% Triton X-100、1 mM NaVO_4 、1 mM Phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) 、10 $\mu\text{g/ml}$ Antipain、10 $\mu\text{g/ml}$ Leupeptin、10 $\mu\text{g/ml}$ Aprotinin) を加えてスクレーパーで細胞を回収し、氷上に 15 分間静置し、 4°C 、14000 rpm で 15 分間遠心分離を行い、上清を回収した。回収した細胞抽出液内のタンパク質は BCATM タンパク質定量キット (Pierce) を用いて測定した。細胞抽出液を SDS-PAGE に供し、泳動後、分離したタンパク質を Polyvinylidene difluoride (PVDF) メンブレンに転写した。転写したメンブレンは 5% BSA/Tris 緩衝生理食塩水/0.1% Tween 20 (TBS-T) でブロッキングし、各種一次抗体を反応させた。TBS-T で 15 分、3 回洗浄し、二次抗体を反応させた。再び洗浄を行った後に、Chemi-lumi One L を用いて二次抗体に標識させ、Horseradish peroxidase (HRP) による化学発光を LAS4000mini で検出した。

3-3-6. 細胞生存率の測定

内皮細胞を 24 ウェルプレートに 5×10^4 cell/well で播種し 7 時間接着させて、1% FBS の培地に変え 17 時間培養した後、培地を交換した。その後各化合物を添加し、24 時間培養した。24 時間後、PBS で 2 回洗浄し、1% FBS を含む DMEM

に H_2O_2 (800 μM) を添加し、24 時間培養した。培養後、Trypsin/EDTA を用いて細胞をディッシュから回収し、0.5% Trypan blue 染色液と混合して、Countess II FL Automated Cell Counter (Invitrogen) を用いて細胞生存率を測定した。

3-3-7. ROS の測定

3×10^5 の内皮細胞を 3.5 cm ディッシュに播種し、10% FBS を含む DMEM で 8 時間かけて接着させ、1% FBS の培地に変えて 16 時間培養した後、10 μM のレスベラトロールと ϵ -ビニフェリンを添加し、24 時間培養した。HBSS で 2 回洗浄し、5 μM の 2',7'-DCFH-DA を添加し、細胞に取り込ませるために 15 分培養した。その後、750 μM の H_2O_2 を添加し、さらに 10 分後、HBSS で 2 回洗浄し、2 ml の HBSS を添加し測定を行った。共焦点顕微鏡で 488 nm の励起波長で生じた**蛍光強度**を測定し、細胞内 ROS 産生レベルを測定した。

3-3-8. Real-time PCR

内皮細胞を 3.5 cm ディッシュに 2×10^5 個播種し、10% FBS を含む DMEM で 8 時間かけて接着させ、1% FBS の培地に変えて 16 時間培養した後、培地を交換した。各化合物と H_2O_2 (400 μM) を添加して 24 時間反応させ、PBS (-) で 2 回洗浄し、 -80°C で保存した。RNA 抽出のためディッシュに ISOGEN を加えて、5 分間静置し、スクレーパーで細胞を回収して、ISOGEN の 5 分の 1 の DEPC 処理水を加えて、激しく混合後再び 5 分間静置し、 4°C 、4000 rpm で 15 分間遠心分離を行い、最上層のみを回収した。回収した細胞上清と同じ量の Isopropanol を加え、軽く混合後、10 分間静置し、再び 4°C 、14000 rpm で 10 分間遠心分離を行った。上清を除去し、沈殿に 70%の Ethanol を加えて 4°C 、7500 rpm で 5 分間遠心分離を行い、上清を除去し、Total RNA の沈殿を得た後、ナノドロップを用いて 260/280 nm を測定した。RNA の濃度を算出し、cDNA

合成キット(東洋紡)でcDNAに逆転写し、2 µg の cDNA と 10 µg の SYBR Green とプライマー (Table 1) 0.5 µg を用いて Real-time PCR による mRNA の測定を行った。

3-3-9. MTS assay による増殖の測定

内皮細胞を 96 ウェルプレートに播種し、10% FBS を含む DMEM で 8 時間かけて接着させ、1% FBS の培地に変えて 16 時間培養した後、50、100、200、400 µM の H₂O₂ を添加し、24 時間培養した。その後 PBS で 2 回洗浄し、CellTiter 96 Aqueous One Solution Reagent を 20 µl/well を添加し、2 時間培養した後、Ultramark Microplate Imaging System (BIO RAD) を用いて 490 nm の波長における吸光度を測定した。

3-3-10. 統計処理

実験結果は、平均値±標準誤差で示した。各集団の比較には ANOVA 検定を行い、また Tukey の検定で多重比較分析した。P<0.05 の場合に有意であると判断した。

3-4 結果

3-4-1. 内皮細胞における創傷治癒の促進およびその経路

3-4-1-1. レスベラトロール、 ϵ -ビニフェリン、および δ -ビニフェリンが血管内皮細胞の創傷治癒に与える影響

内皮細胞の修復は初期段階の動脈硬化を予防するため、レスベラトロール、 ϵ -ビニフェリン、および δ -ビニフェリンの創傷治癒の促進能力を比較した。

各化合物を 5、10、20 μ M の濃度で内皮細胞に添加し、24 時間の創傷治癒の促進効果を比較した。Fig.3-2 に示すように、10 μ M と 20 μ M のレスベラトロール、5 μ M の δ -ビニフェリンと 5、10、20 μ M の ϵ -ビニフェリンが創傷治癒を有意に促進した。また、5 μ M の δ -ビニフェリンおよび ϵ -ビニフェリン、10 μ M と 20 μ M の ϵ -ビニフェリンが、レスベラトロールよりも強い促進効果を示した。

3-4-1-2. レスベラトロール、 ϵ -ビニフェリン、および δ -ビニフェリンが血管内皮細胞の NO 産生に与える影響

内皮細胞の創傷治癒および増殖能は NO 産生に依存している^{107,108}。そのため、レスベラトロール、 ϵ -ビニフェリン、および δ -ビニフェリンにおける NO 産生を検討した。実験は 5 μ M の δ -ビニフェリン、10 μ M のレスベラトロールと ϵ -ビニフェリンを添加して、24 時間後 DAF2-DA によって細胞内 NO を検出した。Fig.3-3 に示すように、各化合物が NO 産生を有意に増加させた。さらに ϵ -ビニフェリンは、同じ濃度のレスベラトロールおよび 5 μ M の δ -ビニフェリンより強く NO 産生を誘導することが明らかとなった。

3-4-1-3. NO 産生阻害がレスベラトロール、 ϵ -ビニフェリン、および δ -ビニフェリンの血管内皮細胞における創傷治癒促進に与える影響

各化合物が NO を介して創傷治癒を促進するか否かを検討した。実験は NOS

の阻害剤 L-NAME を用いて細胞内の NOS 活性を阻害し、各化合物を加えて、創傷治癒促進効果を解析した。Fig.3-4 に示すように、L-NAME 処理した内皮細胞では各化合物による創傷治癒促進は有意に抑制された。このことから、レスベラトロール、 ϵ -ビニフェリン、 δ -ビニフェリンによる内皮細胞の創傷治癒の促進作用は、NO 産生に依存することが明らかとなった。

3-4-1-4. レスベラトロール、 ϵ -ビニフェリン、 δ -ビニフェリンが血管内皮細胞の eNOS のリン酸化、SIRT1、および HO-1 の発現に与える影響

内皮細胞における NO 産生は eNOS により誘導され、eNOS は Ser1177 のリン酸化によって活性化されることから、ウエスタンブロット法で各化合物が eNOS の活性化に与える影響を解析した。5 μ M の δ -ビニフェリンと 10 μ M のレスベラトロールおよび ϵ -ビニフェリンを細胞に添加した後、6、12、24 時間後に細胞を回収し eNOS のリン酸化を検出した。Fig.3-5 に示すように、各化合物の添加後 6 時間から 12 時間において、eNOS のリン酸化が促進されることが明らかになった。さらに、eNOS のリン酸化を促進する SIRT1 と HO-1 の発現量も増加した。以上の結果から、各化合物が SIRT1 と HO-1 を介して eNOS のリン酸化を促進することで、eNOS を活性化する可能性が示唆された。

3-4-1-5. SIRT1 の阻害剤 EX527 と HO-1 の阻害剤 ZnPPXI のレスベラトロール、 ϵ -ビニフェリン、および δ -ビニフェリンの創傷治癒促進効果への影響

SIRT1 と HO-1 は eNOS の活性化を調節し、また NO 産生を誘導することが知られている。そのため、各化合物によって誘導した SIRT1 と HO-1 が創傷治癒にどのような影響を及ぼすかを検討した。実験では、SIRT1 活性阻害剤 EX527 と HO-1 活性阻害剤 ZnPPXI 存在下での各化合物による創傷治癒の促進効果を解析した。Fig.3-6 に示すように、EX527 や ZnPPXI を添加した内皮細胞

では創傷治癒能力はほぼ完全に抑制された。以上の結果は、各化合物による内皮細胞の創傷治癒に、SIRT1 と HO-1 が関わっていることを示している。

3-4-1-6. レスベラトロールおよび ϵ -ビニフェリンによる SIRT1 と HO-1 の発現に及ぼす各種阻害剤の影響

レスベラトロールと ϵ -ビニフェリンはいずれも SIRT1 と HO-1 の発現を誘導したが、SIRT1 と HO-1 の上下流関係を明らかにするため、SIRT1 と HO-1 の活性阻害剤を用いて実験を行った。結果は Fig.3-7A に示すように、HO-1 の阻害剤 ZnPPXI を加えると SIRT1 の発現が減少し、これをレスベラトロールと ϵ -ビニフェリンが抑制した。これに対して、SIRT1 の阻害剤 EX527 を加えても HO-1 の発現に変化は見られなかった。以上の結果によって、HO-1 は SIRT1 の上流にあることが示唆された。また、Fig.3-7B では NO 産生を阻害すると SIRT1 の発現も抑制されることが示された。この結果は NO が SIRT1 の発現を誘導することを示唆している。

3-4-1-7. レスベラトロールと ϵ -ビニフェリンの AKT および AMPK のリン酸化への影響

HO-1 によって誘導された脱アセチル化機能を持つ SIRT1 が、eNOS を脱アセチル化することで AKT や AMPK によってリン酸化される可能性が考えられる。そこで、両化合物による AKT と AMPK のリン酸化への影響を検討した。Fig.3-8A に示すように、レスベラトロールは AMPK のリン酸を誘導したが、AKT に対しての誘導効果は弱かった。これに対して ϵ -ビニフェリンは AKT と AMPK の両者のリン酸化を誘導した。この結果は ϵ -ビニフェリンがレスベラトロールより NO 産生や創傷治癒効果が高かった結果と一致する。また、Fig.3-8B では SIRT1 の阻害剤 EX527、AMPK の阻害剤 Compound C と AKT の阻害剤 LY294002 を用いて、SIRT1、AMPK と AKT の経路を再検証した。そ

の結果、用いた 3 種の阻害剤は全てレスベラトロールと ϵ -ビニフェリンによる eNOS のリン酸化を抑えされるデータが得られた。

3-4-2. 内皮細胞への抗酸化能力の付与

3-4-2-1. レスベラトロール、 ϵ -ビニフェリン、および δ -ビニフェリンによる酸化ストレス依存的な細胞生存率低下の改善効果

体内の過剰な ROS は内皮細胞に損傷を与えて動脈硬化の発症の引き金となることが知られている。レスベラトロール、 ϵ -ビニフェリン、および δ -ビニフェリンが内皮細胞に対して抗酸化能を示すか否かを検討した。Fig.3-9 に示すように、 H_2O_2 による酸化ストレスは内皮細胞の生存率を 20%程度減少させた。これに対し、10 μ M のレスベラトロールと ϵ -ビニフェリン、5 μ M の δ -ビニフェリンは、24 時間前に処理すると内皮細胞の生存率の低下がほぼ完全に抑制された。この結果は、3 種の化合物が内皮細胞に対し酸化ストレス抵抗性を付与することを意味している。

3-4-2-2. レスベラトロール、 ϵ -ビニフェリン、および δ -ビニフェリンによる抗酸化酵素 Catalase の発現促進効果

Catalase には体内に存在する過酸化水素を分解する役割がある。レスベラトロール、 ϵ -ビニフェリン、および δ -ビニフェリンは酸化ストレスを受ける内皮細胞の生存率を改善できることから、Catalase の発現促進効果も期待できる。ウエスタンブロット法により、各化合物の Catalase の発現促進効果の解析を行った。Fig.3-10 に示すように、各化合物の添加により Catalase は時間依存的に発現量が増加した。また、 δ -ビニフェリンは、レスベラトロールや ϵ -ビニフェリンと比較して発現増加までの時間が長くなっている。この結果は Fig.3-5C の HO-1 の発現結果と類似している。

3-4-2-3. レスベラトロール、 ϵ -ビニフェリン、および δ -ビニフェリンの濃度依存的な Catalase の発現促進効果

Fig.3-10 のデータにおいて、各化合物は内皮細胞の Catalase 発現を促進した。そこで、各化合物の濃度ごとに Catalase 発現を比較した。5、10、20 μ M のレスベラトロールと ϵ -ビニフェリン、および δ -ビニフェリンを添加し 24 時間培養した細胞での Catalase 発現を解析した。Fig.3-11 に示すように、10 および 20 μ M の ϵ -ビニフェリンを添加した内皮細胞では、Catalase の発現が有意に増加した。またこれは、レスベラトロールと δ -ビニフェリンより Catalase 発現の促進効果が強いことを示唆している。更に、10 μ M の ϵ -ビニフェリン 1 時間の影響を解析した。Fig.3-12 に示すように、Catalase、SIRT1、リン酸化 AMPK と FOXO3a の発現が時間依存的に増加することが観察された。

3-4-3. 内皮細胞の細胞接着因子の発現への影響

3-4-3-1. レスベラトロールと ϵ -ビニフェリンが細胞内 ROS 濃度に与える影響

ϵ -ビニフェリンとレスベラトロールが実際に細胞内の ROS 濃度に与える影響を検討した。Fig.3-13 に示すように、10 μ M の ϵ -ビニフェリンとレスベラトロールを添加し 24 時間培養し、その後化合物を洗浄除去し H_2O_2 を添加した。いずれも、化合物で前処理すると細胞内の ROS 濃度は有意に低下した。この結果は、両化合物が細胞に ROS 除去能力を付与したことを意味する。

3-4-3-2. レスベラトロールと ϵ -ビニフェリンの H_2O_2 による NF- κ B 活性化の抑制効果

NF- κ B は炎症に関わる転写因子であり、細胞内で様々な免疫反応を引き起こす。酸化ストレスは NF- κ B 活性化の引き金の一つであり、さらに接着因子の転写を誘導する。酸化ストレスが内皮細胞の NF- κ B を活性化させるか否かを

確かめるため、 H_2O_2 を添加する実験を行った。Fig.3-14 の A と B に示すように、 $400 \mu M$ の H_2O_2 は NF- κB 活性化タンパク P65 と I κB のリン酸化を誘導した。続いて、両化合物が NF- κB の活性を阻害するか否かを確認する実験を行った。Fig.3-14 の C と D に示すように、 H_2O_2 は NF- κB の活性に関わるタンパク質 P65 と I κB のリン酸化の発現レベルを有意に増加させることが示されたが、 $30 \mu M$ のレスベラトロールと $10 \mu M$ の ϵ -ビニフェリンの添加によって P65 と I κB のリン酸化の発現レベルは減少し、NF- κB の活性が抑制されることが判明した。

3-4-3-3. レスベラトロールと ϵ -ビニフェリンによる酸化ストレス依存的な接着因子 ICAM-1、VCAM-1 および E-セレクチンの発現抑制効果

動脈硬化を引き起こす接着因子は酸化ストレスや炎症性サイトカインの刺激によって誘導され、血液中の単球を接着して、血管の損傷部位から内皮細胞の内側に侵入する。これにより平滑筋細胞の増殖と遊走が引き起こされ、血管の肥厚と硬化が誘導される。そして最終的に血栓や動脈硬化症を発症する。Fig.3-15 に示すように、 H_2O_2 により E-selectin の mRNA 発現量が有意に増加した。 $30 \mu M$ のレスベラトロールと $10 \mu M$ の ϵ -ビニフェリンを加えたところ、 H_2O_2 による E-セレクチンの発現量は有意に減少した。ICAM-1 と VCAM-1 に関しては同様の効果は観察されなかった。

3-5 考察

メタボリック症候群により引き起こされる動脈硬化は、心筋梗塞や脳卒中のような死亡率の高い疾病の原因となる。従って、動脈硬化の発症・進展を防ぐことが重要となる。本研究では、赤ワインポリフェノールのレスベラトロールとその二量体である ϵ -ビニフェリンおよび δ -ビニフェリンに着目し、それらの血管に対する機能性を比較検討することを目的とした。

具体的には、以下の3つの視点から動脈硬化に対する3種の化合物の予防・改善効果を評価した。第一は、単球の内膜侵入と血管プラークの産生を防ぐことに繋がる NO 産生能と血管内膜の損傷修復作用、第二は、抗酸化酵素 Catalase の発現誘導による、ストレスで過剰産生される ROS による内皮細胞への損傷の抑制、第三は、酸化ストレスによる誘導される炎症経路に働く転写因子 NF- κ B の活性化阻害と血管接着因子の発現抑制である。

まず、第一の視点として、3種の化合物が内皮細胞の創傷治癒を有意に促進することを明らかにした。3種の化合物の中でも、 ϵ -ビニフェリンは 5、10、20 μ M の全ての濃度で有意な促進効果を示し、最も強い効果を示した。また、レスベラトロールも有意な促進効果を示したが、同じ濃度での ϵ -ビニフェリンはレスベラトロールより促進効果が強かった。 δ -ビニフェリンはレスベラトロールおよび ϵ -ビニフェリンと違い、5 μ M において促進効果が最も強かった。つまり、3種の化合物の間で創傷治癒における濃度依存性の強さが異なることが明らかとなった。

内皮細胞における創傷治癒効果は NO 産生に依存するが、3種の化合物はすべて NO 産生を誘導することも確認された。中でも ϵ -ビニフェリンは、レスベラトロールと δ -ビニフェリンよりも強い誘導機能を示した、この結果は創傷治癒の結果と一致する。また、eNOS の阻害剤 L-NAME で NO 産生を阻害すると、3種の化合物の効果がほぼ完全に抑制された。この結果は内皮細胞における創傷治癒機能に対して NO 産生が不可欠であることを示している。また、3種の

化合物による内皮細胞の創傷治癒はHO-1とSIRT1の阻害剤でそれぞれ抑制された。この結果は、3種の化合物の作用にHO-1はSIRT1の両方が不可欠であることを示しているが、実験の結果、HO-1がSIRT1の上流に位置することが明らかとなった。さらにAKTとAMPKによりeNOSがリン酸化されることも確認された。また、文献によるとHO-1はSIRT1を介して、非アルコール性脂肪肝疾患マウスの肝細胞の脂質蓄積と線維化を減少させ、さらに酸化ストレスを抑制する¹⁰⁹。本実験のレスベラトロールとε-ビニフェリンにおいても同様の経路が示された。

本研究の第二の視点として、3種の化合物が酸化ストレスに対する細胞保護作用を示すことを証明した。酸化ストレスは内皮細胞に傷害や細胞死をもたらし、最終的に単球の侵入、酸化LDLの蓄積および血管プラークを形成し、動脈硬化を引き起こす³⁴。本研究では、レスベラトロール、ε-ビニフェリン、δ-ビニフェリンが内皮細胞中の抗酸化酵素Catalaseの発現を増加させ、酸化ストレスによる細胞死を抑制することが明らかとなった。また、ε-ビニフェリンはレスベラトロールやδ-ビニフェリンより、Catalase誘導効果が強いことも示された。

本研究の第三の視点として、レスベラトロールとε-ビニフェリンがNF-κBの活性を抑え、接着因子の誘導を阻害することを明らかにした。NF-κBは炎症経路に関わる分子として知られており、細胞の成長、キナーゼの活性化、炎症およびアポトーシスまで幅広い機能と関与している¹⁰⁵。本研究では、400 μMのH₂O₂で内皮細胞表面の接着因子を誘導し、ε-ビニフェリンとレスベラトロールによる抗炎症機能を検証した。その結果、レスベラトロールとε-ビニフェリンを作用させると、400 μMのH₂O₂により誘導されたNF-κBのサブユニットP-65の活性化が有意に減少することが示された。さらに接着因子E-セレクトインのmRNAも有意に減少させることも確認した。この結果からε-ビニフェリンが酸化ストレスによる接着因子を抑制することが明らかとなった。

本研究の3つの視点により、赤ワインポリフェノールの機能性と SIRT-1 と HO-1 とが深く関与していることが証明された。過去の研究より、HO-1 がキナーゼ AKT と AMPK を介して eNOS を活性化し^{110,111}、SIRT1 は脱アセチル化を用いて eNOS と直接結合し、eNOS カルモジュリン結合ドメインにある Lysine の 496 番と 506 番を脱アセチル化し¹⁰²、キナーゼ AKT と AMPK の協力により eNOS を活性化させる¹¹² ことが示されている。本研究では HO-1 と SIRT1 の2つの経路を合わせて検討し、HO-1 と SIRT1 の両方が eNOS の S1177 をリン酸化し活性化させることを明らかにした。HO-1 は上流から SIRT1 の発現を誘導し、リン酸化 AKT と AMPK も加えて eNOS を活性化し、NO の産生増加をもたらすと考えられる。

HO-1 は Keap-1-NRF-2-ARE の経路を介して発現され¹¹³、また、SIRT1 は AMPK の活性化と FOXO ファミリー (FOXO1a、FOXO3a と FOXO3a) により、Catalase と Mn-SOD を発現する。この2つの経路は、細胞の酸化ストレスの刺激により起動されることが報告されている^{48,65}。本研究では、赤ワインポリフェノールのレスベラトロール、 ϵ -ビニフェリン、 δ -ビニフェリンが Catalase の発現を誘導することが示された。さらに、 ϵ -ビニフェリンは SIRT1-AMPK-FOXO3A 経路の発現を誘導できることも証明した、その結果として ϵ -ビニフェリンは HO-1 と SIRT 両方の経路を介して Catalase 発現を誘導する可能性が示唆された。

過去の研究により、HO-1 も SIRT1 も転写因子 NF- κ B の活性化抑制を介して接着分子の発現を抑制することが分かっている。そのメカニズムを比べると、SIRT1 は直接 NF- κ B を脱アセチル化することにより NF- κ B の活性化を抑制し、接着分子の発現を抑制する¹¹⁴。また HO-1 と Bilirubin による NF- κ B の活性化抑制を介した VCAM-1 や E-selectin の発現抑制が報告されている⁸⁹。別の研究では、CO の誘導剤 CORM-2 が転写因子 NF- κ B と AP-1 (c-Jun、c-Jun、c-Fos) の活性を抑制し、VCAM-1 発現を制御して炎症を抑制、あるいは関節リウマチ

を予防することが報告されている¹¹⁵。本研究では誘導剤 CORM-2 で内皮細胞の CO 量を増加させたが、SIRT1 の発現には影響が見られず、この結果は CO による NF- κ B の活性阻害は別経路を経由する可能性を示している。動物実験において、動脈硬化では血管内皮における免疫グロブリンスーパーファミリーである VCAM-1 の発現は ICAM-1 より影響が大きいとの報告がある⁸⁴。本研究でも ICAM-1 の mRNA 発現量を検討したが、過去の研究と同様の大きな変化は認められなかった。

HO-1-SIRT1 経路の研究はまだ多くはない。2015 年、肝細胞において Fructose により発現が減少した SIRT1 が、HO-1 の誘導剤 Cobalt Protoporphyrin の添加により回復し、肝臓の脂肪蓄積と線維化が改善することが報告された¹⁰⁹。動物実験では、HO-1 が過剰発現すると SIRT1 の発現増加が見られ、マウス肝臓の虚血再灌流による臓器傷害が減少する結果が報告されている¹¹⁶。3T3L1 において、Ang II による酸化ストレスが HO-1-SIRT1 を介して抗酸化機能が誘導され、酸化ストレスのダメージが回復したとの報告がある¹¹⁷。なお、非ステロイド系抗炎症薬の Salsalate が HO-1 と SIRT1 の経路により、LPS による NF- κ B を経由し ICAM-1 と VCAM-1 発現を制御するとの報告があり¹¹⁸、本研究と類似する。

本研究では内皮細胞において赤ワインポリフェノールのレスベラトロールとその二量体である ϵ -ビニフェリンと δ -ビニフェリンが、HO-1-SIRT1 の経路を介して NO 産生と創傷治癒機能を誘導することを示した。また抗酸化酵素 Catalase の発現を増加することにより細胞内の ROS を除去し、酸化ストレスによる損傷を減少させ、さらに炎症を引き起こす接着因子の発現を抑えることを明らかにした。本研究で得られたこれら 3 化合物の内皮細胞における作用経路の概要を Fig.3-16 に記す。本研究の未解明の事項は、HO-1 と SIRT1 との間に直接的な相互作用のメカニズムが存在するか否かである。HO-1 がどのようなメカニズムを介して SIRT1 を発現させるのかについては、さらなる研究が必

要である。

3-6 結論

本研究では、内皮細胞における NO 産生と創傷治癒、抗酸化酵素の誘導、および接着因子の制御の 3 つの観点から、赤ワインポリフェノールのレスベラトロールとその二量体である ϵ -ビニフェリン、 δ -ビニフェリンが、類似した機能と作用機序を示すことが示された。また 3 種の化合物の中でも ϵ -ビニフェリンは、NO と創傷治癒、抗酸化酵素 *Catalase* の産生において、レスベラトロールや δ -ビニフェリンよりも強い作用を有することが明らかとなった。これらの結果は、広く知られる機能性成分レスベラトロールに加え、その二量体である ϵ -ビニフェリンと δ -ビニフェリンも、赤ワインによる CVD の予防改善に重要であることを強く示唆するものである。

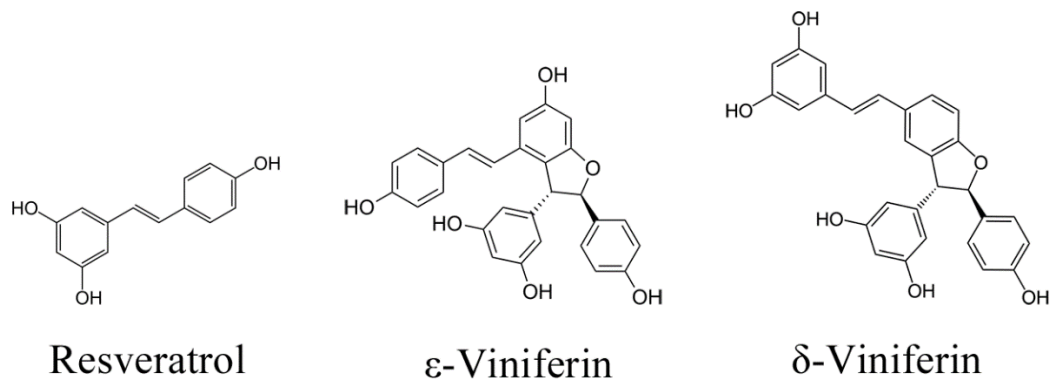


Fig. 3-1 赤ワインポリフェノールのレスベラトロールとその二量体のε-ビニフェリンとδ-ビニフェリンの構造

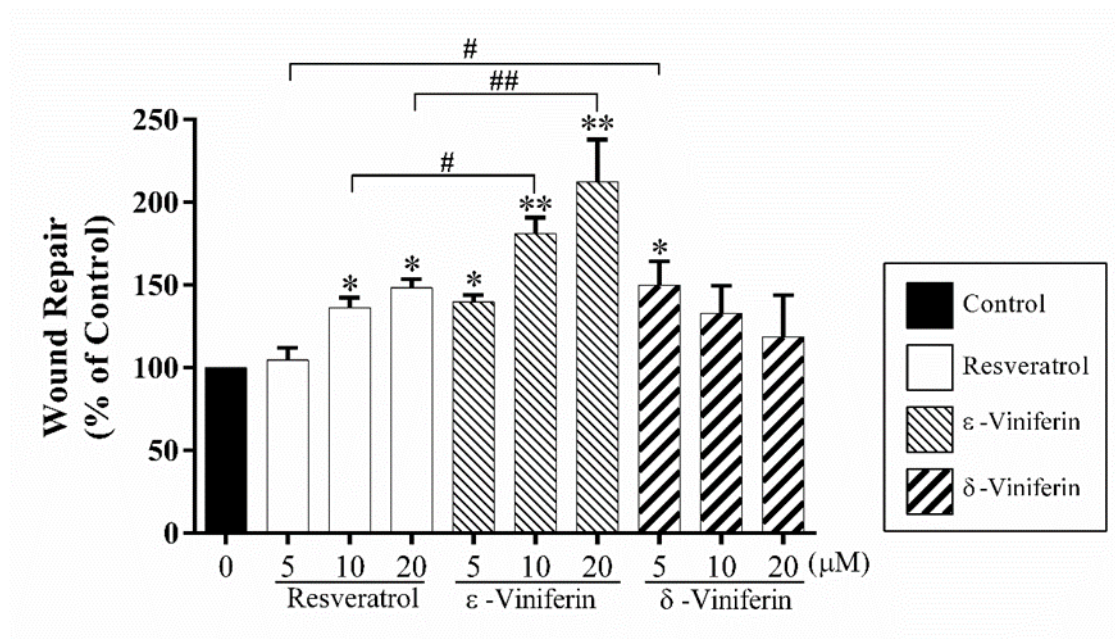


Fig. 3-2 レスベラトロール、ε-ビニフェリン、およびδ-ビニフェリンによる血管内皮細胞の創傷治癒促進効果

1% FBS を含む DMEM で 16 時間同調培養後 (3×10^5 cells/dish)、5、10、20 μM のレスベラトロール、ε-ビニフェリン、およびδ-ビニフェリンを添加し、チップでディッシュの底に疑似的な傷をつけ、顕微鏡で観察して撮影を行った。24 時間培養した後、再び撮影を行い、治癒力を評価した。(n=3, *P<0.05 vs. Control, **P<0.001 vs. Control)

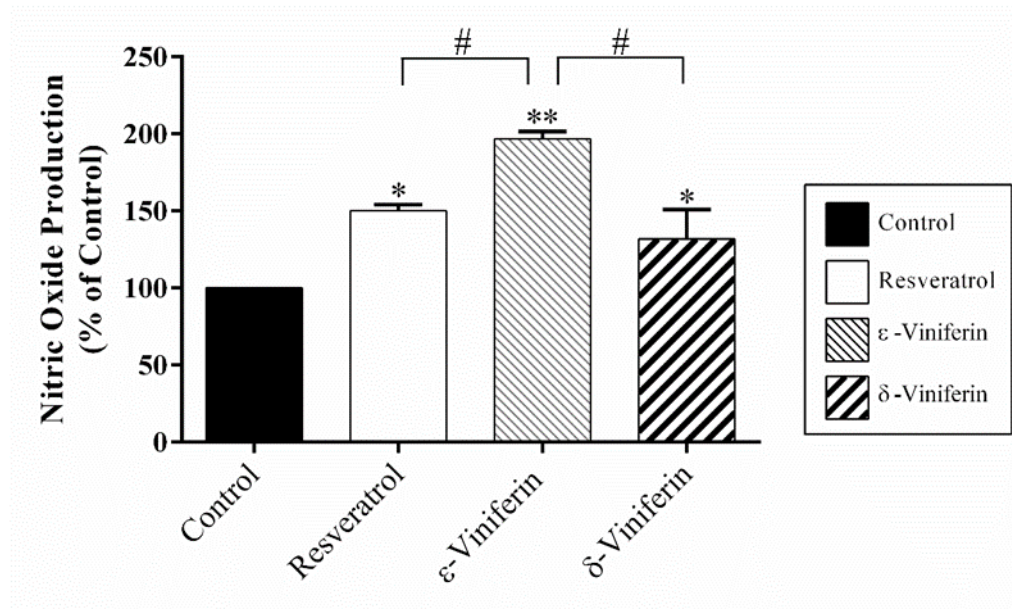


Fig. 3-3 レスベラトロール、ε-ビニフェリン、およびδ-ビニフェリンによる内皮細胞のNO産生促進効果

1% FBS を含む DMEM で 16 時間同調培養後 (5×10^3 cells/ well)、DAF-2DA (10 μ M) を添加して 45 分間培養した。その後、L-Arginine (100 μ M) とともに 10 μ M のレスベラトロールと ε-ビニフェリン、5 μ M の δ-ビニフェリンを添加し、24 時間培養後、NO 産生量を測定した。(n=3, *P<0.05 vs. Control, **P<0.001 vs. Control)

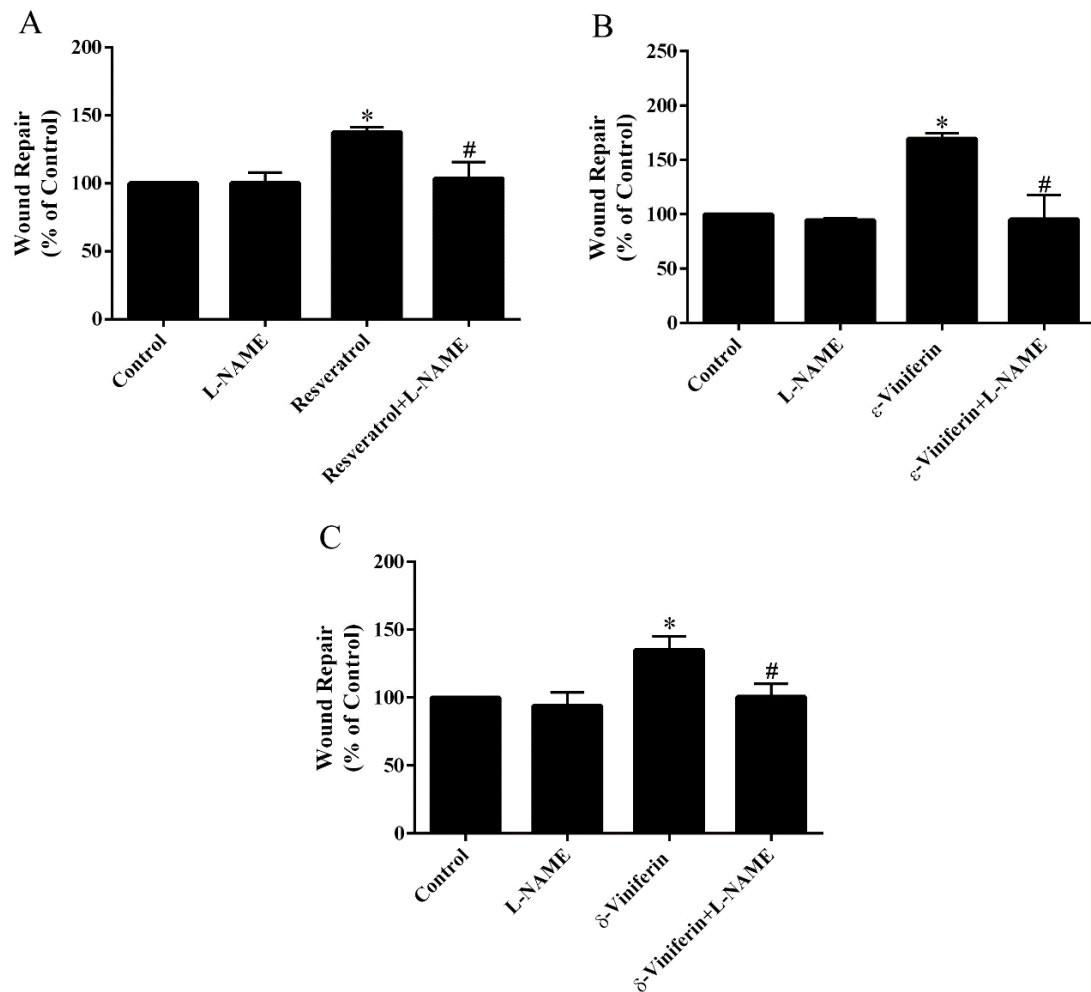


Fig. 3-4 NO 合成酵素阻害剤 (L-NAME) 存在下でのレスベラトロール、 ϵ -ビニフェリン、および δ -ビニフェリンの創傷治癒促進効果

1% FBS を含む DMEM で 16 時間同調培養後 (3×10^5 cells/dish)、1 mM L-NAME で 1 時間処理し、(A) 10 μ M のレスベラトロールと (B) ϵ -ビニフェリン、および (C) 5 μ M の δ -ビニフェリンを添加し、チップでディッシュの底に疑似的な傷をつけ、顕微鏡で観察して撮影を行った。24 時間培養した後再び撮影を行い、治癒力を評価した。(n=3, *P<0.05 vs. Control, #P<0.05 vs. Resveratrol, ϵ -Viniferin or δ -Viniferin)

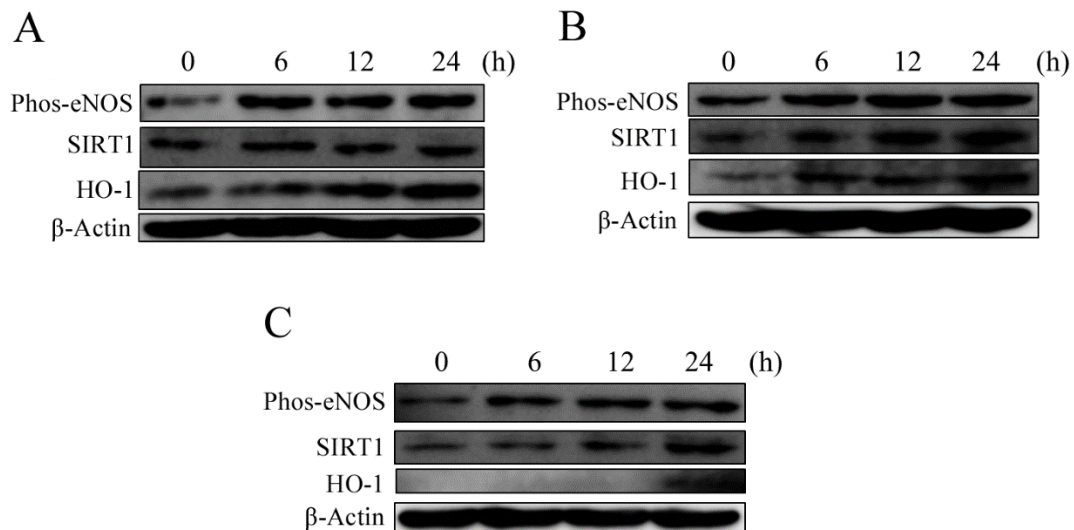


Fig. 3-5 レスベラトロール、 ϵ -ビニフェリン、 δ -ビニフェリンによる内皮細胞での eNOS のリン酸化、および SIRT1 と HO-1 の発現促進効果

1% FBS を含む DMEM で 16 時間同調培養後 (3×10^5 cells/dish)、10 μ M のレスベラトロールと ϵ -ビニフェリン、5 μ M の δ -ビニフェリンを添加し、各時間で細胞を回収し、ウエスタンブロット法により eNOS のリン酸化、SIRT1 と HO-1 の発現レベルを解析した。同様の実験を 3 回行った。

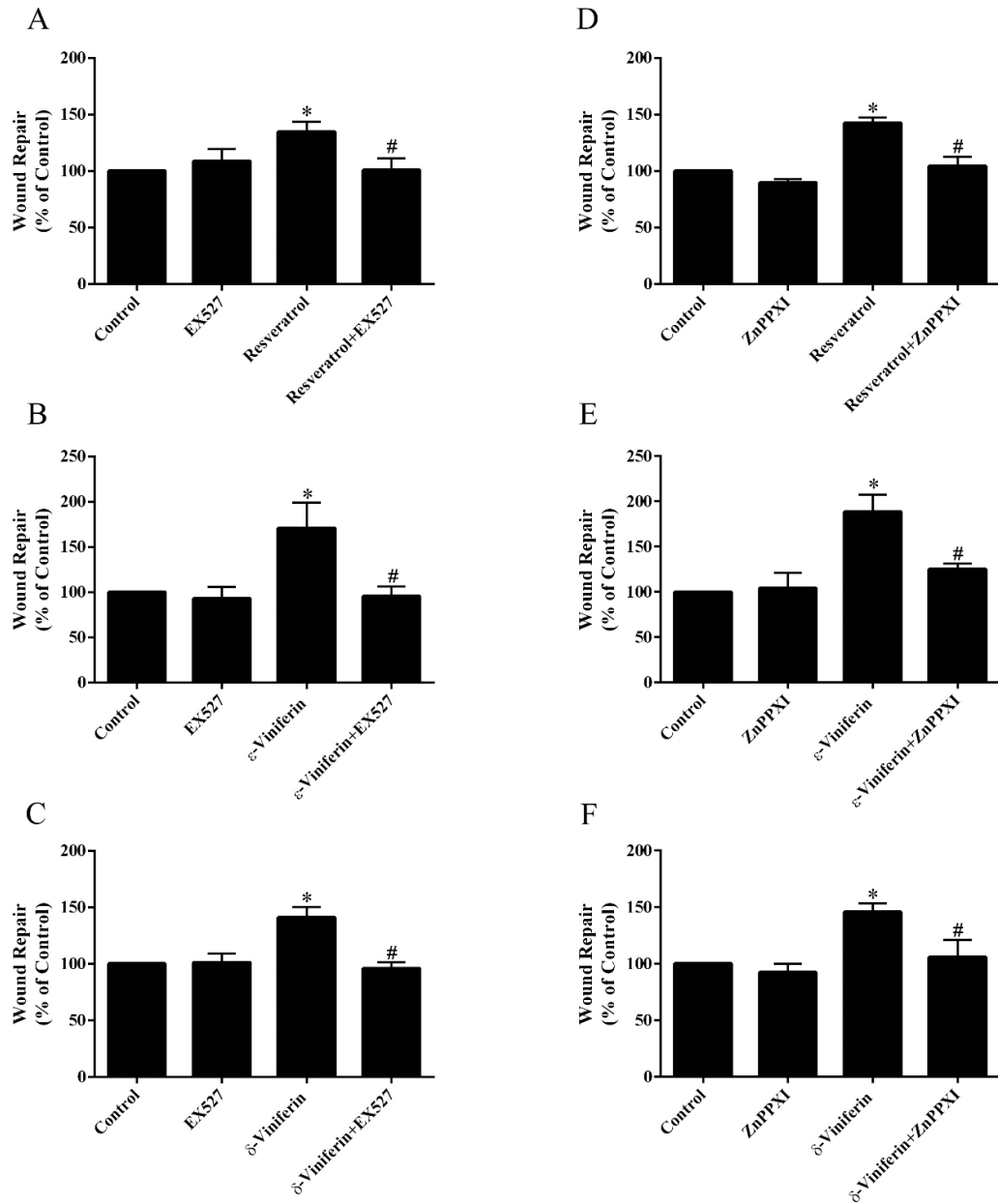
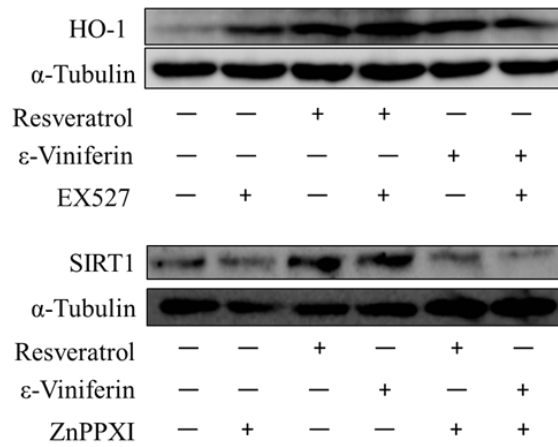


Fig. 3-6 SIRT1 の阻害剤 EX527 と HO-1 の阻害剤 ZnPPXI 存在下でのレスベラトロール、 ϵ -ビニフェリンおよび δ -ビニフェリンの創傷治癒促進効果

1% FBS を含む DMEM で 16 時間同調培養後 (3×10^5 cells/dish)、10 μ M の EX527 (Sirt1 活性阻害剤) と 1 μ M の ZnPPXI (HO-1 阻害剤) で 1 時間処理し、10 μ M のレスベラトロールと ϵ -ビニフェリン、5 μ M の δ -ビニフェリンを添加し、チップでディッシュの底に疑似的な傷をつけ、顕微鏡で観察して撮影を行

った。24 時間培養した後、再び撮影を行い、治癒力を評価した。(n=3, *P<0.05 vs. Control, #P<0.05 vs. Resveratrol, ε-Viniferin or δ-Viniferin)

A.



B.

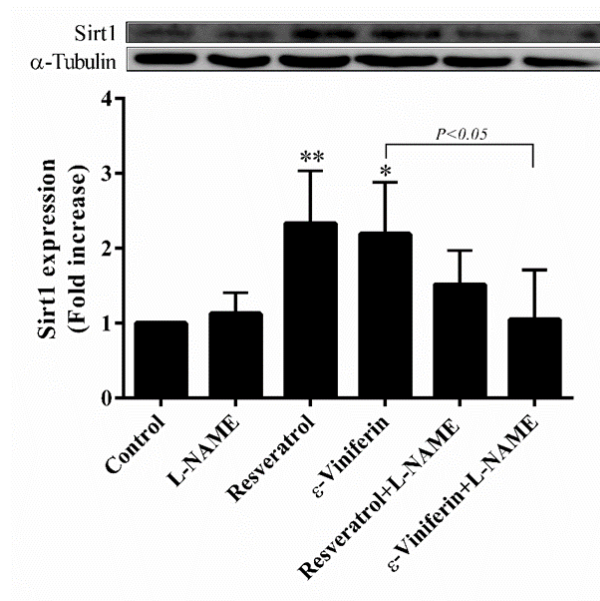
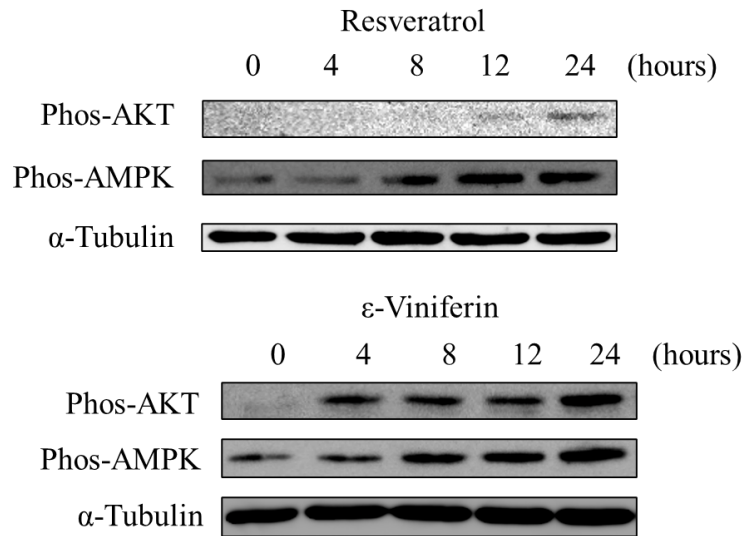


Fig. 3-7 レスベラトロールおよび ε-ビニフェリンによる SIRT1 と HO-1 の発現に及ぼす各種阻害剤の影響

1% FBS を含む DMEM で 16 時間同調培養後 (3×10^5 cells/dish)、 $10 \mu\text{M}$ の EX527 (SIRT1 活性阻害剤)、 $1 \mu\text{M}$ の ZnPPXI (HO-1 阻害剤) 及び 1mM の L-NAME で 1 時間処理し、 $30 \mu\text{M}$ のレスベラトロールと $30 \mu\text{M}$ ε-ビニフェリンを添加し、24 時間培養した後回収し、ウエスタンブロット法により SIRT1 と HO-1 のレベルを解析した。(n=3, *P<0.05 vs. Control, **P<0.001 vs. Control)

A.



B.

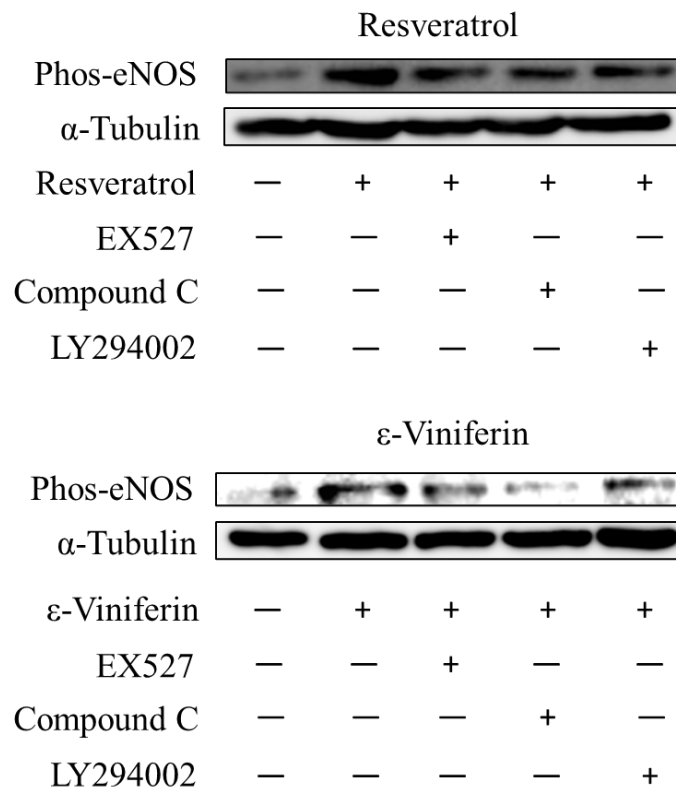


Fig. 3-8 レスベラトロールと ε-ビニフェリンによる AKT と AMPK のリン酸化と eNOS のリン酸化に及ぼす影響

1% FBS を含む DMEM 培地で 16 時間同調培養後 (3×10^5 cells/dish)、(A) 30 μ M のレスベラトロールと 10 μ M ε-ビニフェリンを添加し、各時間で細胞を回収し、

ウエスタンブロット法によりリン酸化 AKT とリン酸化 AMPK のレベルを解析した。(n=3)。(B) 10 μ M の EX527、1 μ M の化合物 C と 30 μ M の LY294002 で 1 時間処理し、30 μ M のレスベラトロールおよび 10 μ M ϵ -ビニフェリンを添加し、24 時間培養した。その後細胞を回収し、ウエスタンブロット法によりリン酸化 eNOS レベルを解析した。(n=3)

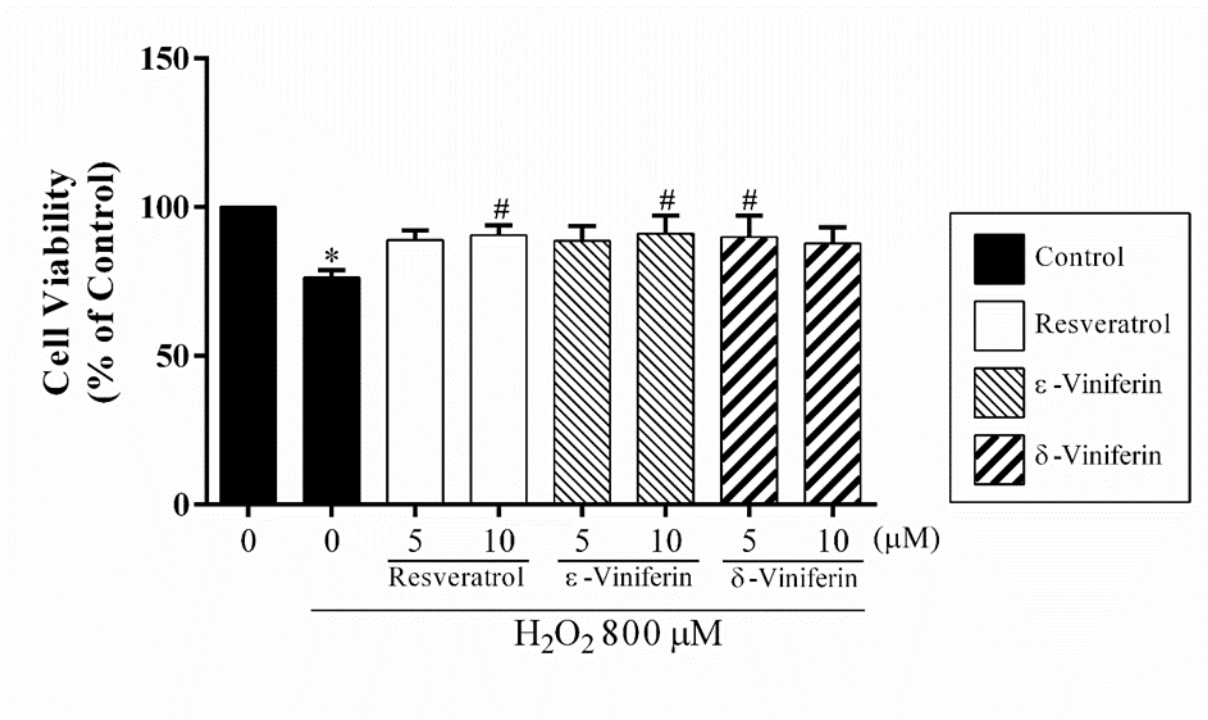


Fig. 3-9 レスベラトロール、ε-ビニフェリン、およびδ-ビニフェリンによる酸化ストレス依存的な細胞生存率低下への改善効果

1% FBS を含む DMEM で 16 時間同調培養後 (5×10^4 cells/well)、5 μM と 10 μM のレスベラトロール、ε-ビニフェリン、および δ-ビニフェリンを添加し、24 時間培養した。その後、PBS (-) を用いて洗浄を行い、添加物を除去した。800 μM の H_2O_2 を添加し 24 時間培養後、Countess を用いて生存率を測定した。(n=3, *P<0.05 vs. Untreated control, #P<0.05 vs. Control)

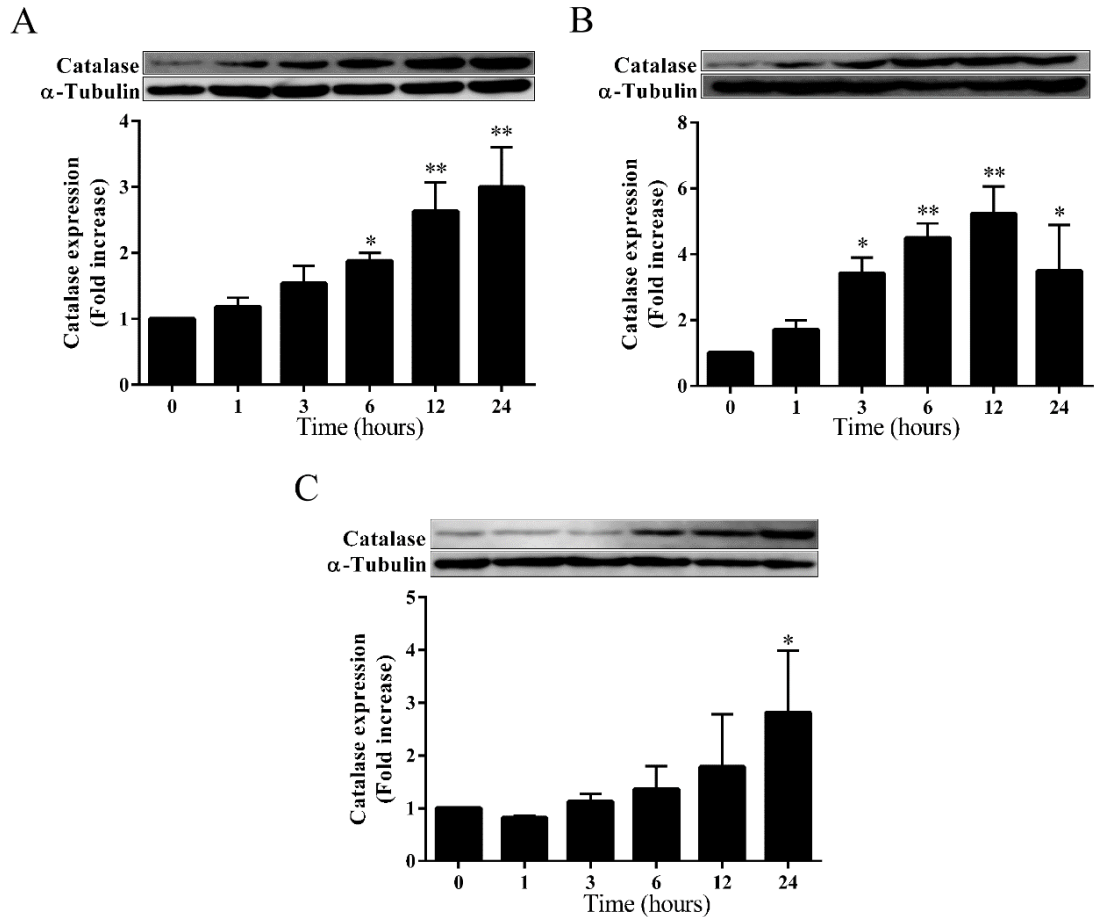


Fig. 3-10 レスベラトロール、 ϵ -ビニフェリン、および δ -ビニフェリンによる抗酸化酵素 Catalase の時間依存的発現促進

1% FBS を含む DMEM で 16 時間同調培養後 (3×10^5 cells/dish)、10 μ M のレスベラトロールと ϵ -ビニフェリン、5 μ M の δ -ビニフェリンを添加し、各時間で細胞を回収し、ウエスタンブロット法により Catalase 発現量を解析した。(n=3, *P<0.05 vs. Control, **P<0.001 vs. Control)

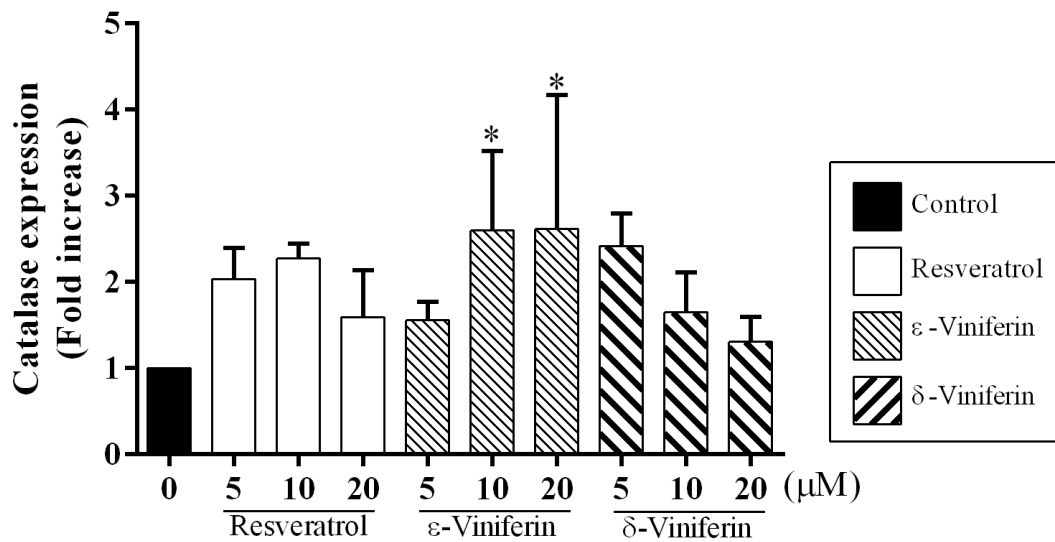


Fig. 3-11 レスベラトロール、ε-ビニフェリン、および δ-ビニフェリンの濃度依存的な抗酸化酵素 **Catalase** の発現誘導効果

1% FBS を含む DMEM で 16 時間同調培養後 (3×10^5 cells/dish)、5、10、20 μM のレスベラトロール、ε-ビニフェリン、および δ-ビニフェリンを添加し、24 時間培養した。各濃度の細胞を回収し、ウエスタンブロット法により **Catalase** 発現量を解析した。(n=3, *P<0.05 vs. Control)

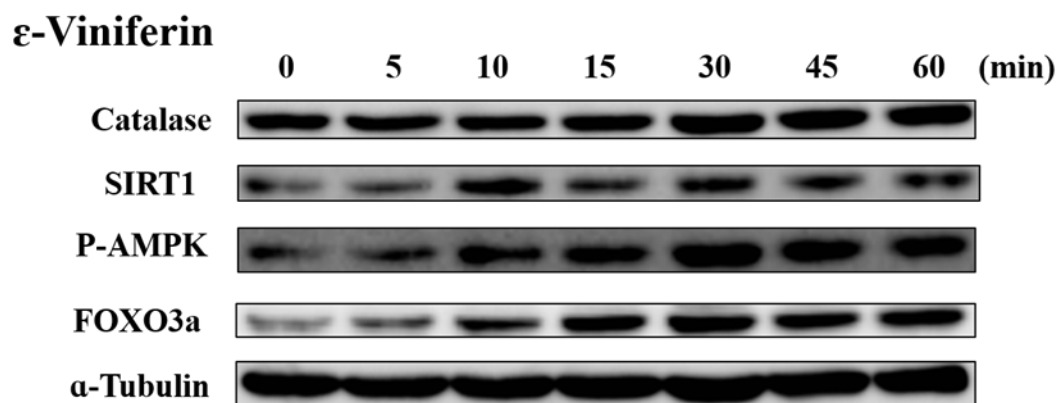


Fig. 3-12 ϵ -ビニフェリンによる1時間までのCatalase、リン酸化AMPK、Sirt1、およびFOXO3aの発現変化

1% FBSを含むDMEMで16時間同調培養後 (3×10^5 cells/dish)、10 μ Mの ϵ -ビニフェリンを添加し、各時間の細胞を回収し、ウエスタンブロット法によりカタラーゼ、Sirt1、リン酸化AMPK、FOXO3aの発現レベルを解析した。(n=3)

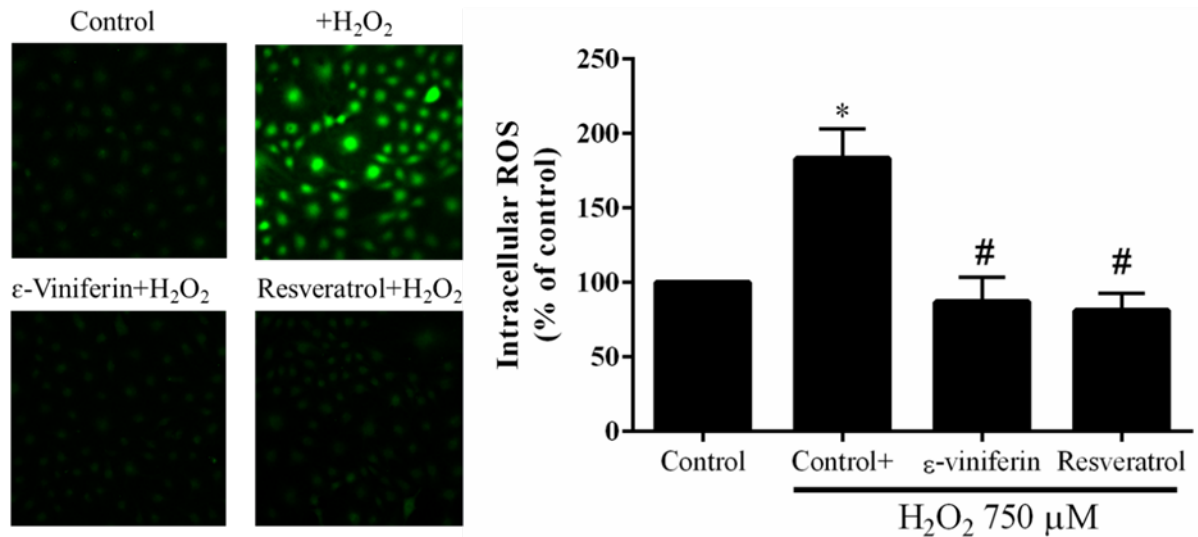


Fig. 3-13 レスベラトロールと ε-ビニフェリンによる細胞内 ROS の消去

1% FBS を含む DMEM で 16 時間同調培養後、10 μM のレスベラトロールと 10 μM の ε-ビニフェリンを添加して 24 時間培養し、HBSS で 2 回洗浄した。5 μM の DCFH-DA を添加して、15 分間培養した。さらに、750 μM の H₂O₂ を添加して 10 分後、2 ml の HBSS を添加し測定を行った。共焦点顕微鏡で細胞内 ROS 産生レベルを測定した。(n=3, *P<0.05 vs. Untreated control, #P<0.05 vs. Control+)

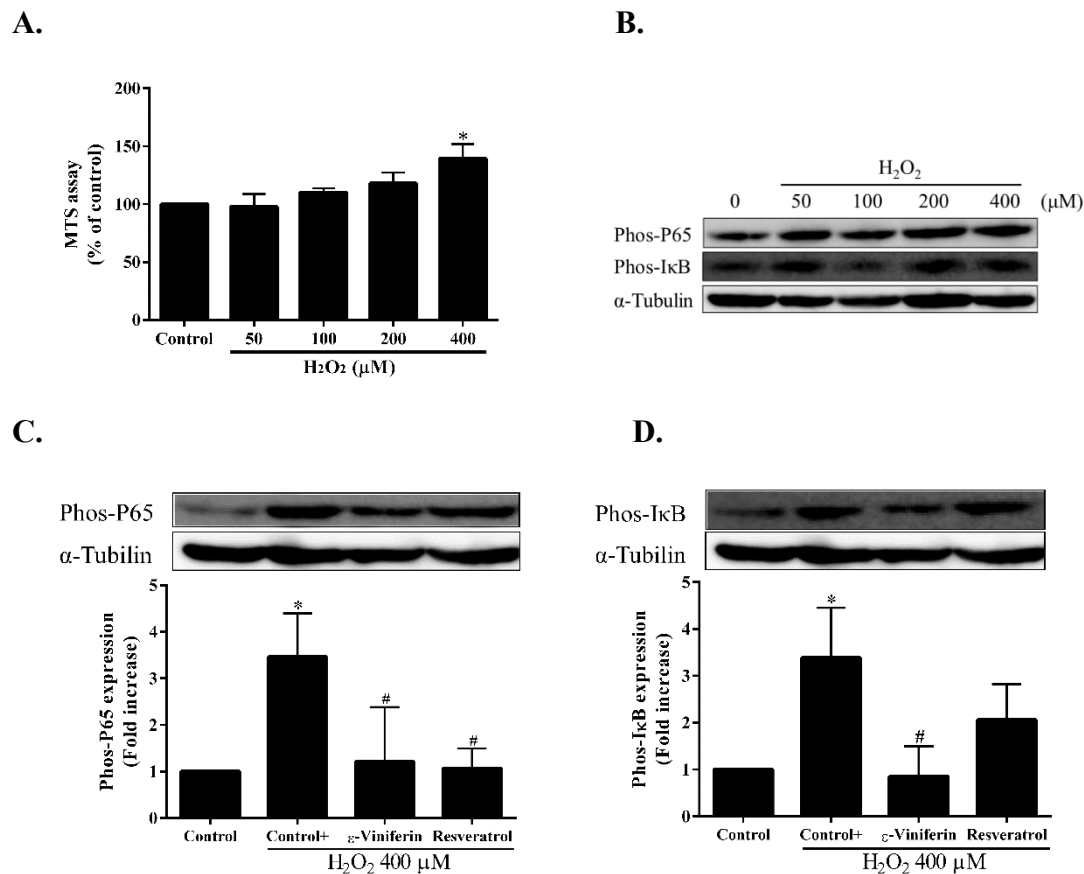


Fig. 3-14 レスベラトロールと ε-ビニフェリンによる酸化ストレス依存性的な NF-κB リン酸化の抑制効果

A、B : 1% FBS を含む DMEM で 16 時間同調培養後 (5×10^3 cells/well) 50、100、200 と 400 μM の H₂O₂ を添加し、24 時間培養後、MTS により生存率を解析した。1% FBS を含む DMEM で 16 時間同調培養後 (3×10^5 cells/dish) 50、100、200、400 μM の H₂O₂ を添加し、24 時間培養後、ウエスタンブロット法により NF-κB-P65 と IκB のリン酸化レベルを解析した。C、D : 1% FBS を含む DMEM で 16 時間同調培養後 (3×10^5 cells/dish)、30 μM のレスベラトロール、10 μM ε-ビニフェリン、400 μM の H₂O₂ を添加し、24 時間共存培養した。その後細胞を回収し、ウエスタンブロット法により NF-κB-P65 と IκB のリン酸化レベルを解析した。(n=3, *P<0.05 vs. Untreated control, #P<0.05 vs. Control+)

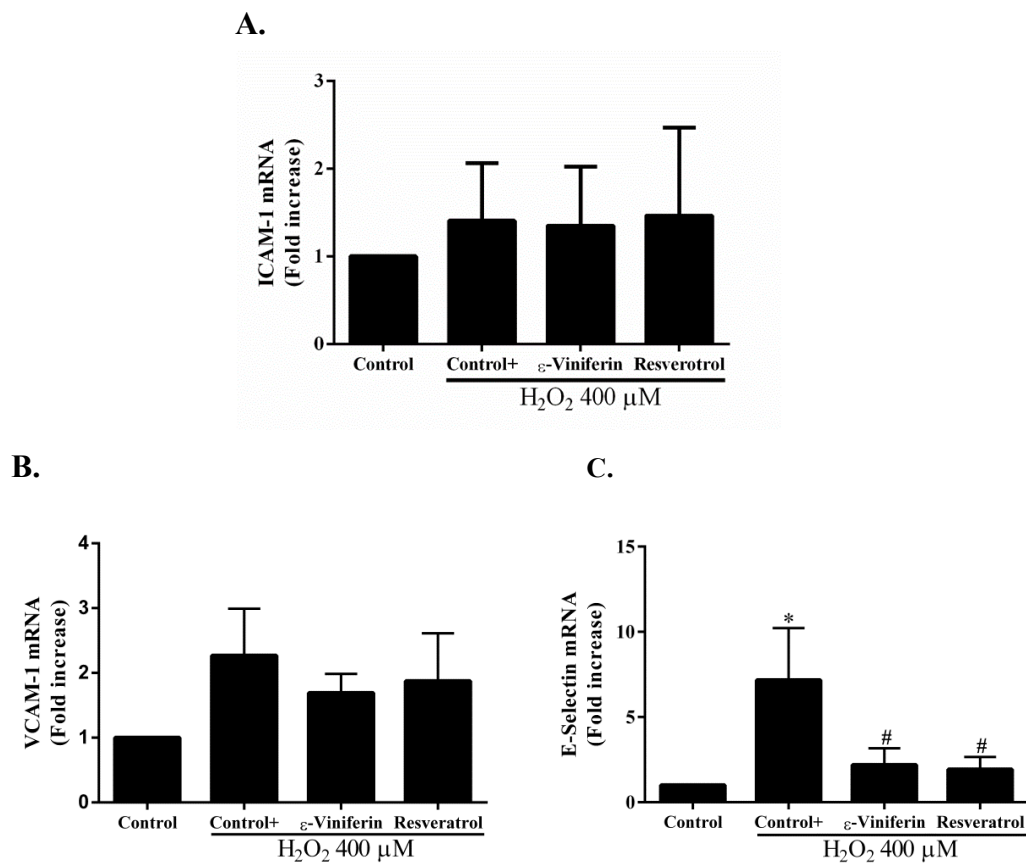


Fig. 3-15 レスベラトロールと ϵ -ビニフェリンによる酸化ストレス依存的な接着因子 VCAM-1 と E-セレクトインの転写に対する抑制効果

1% FBS を含む DMEM で 16 時間同調培養後 (3×10^5 cells/dish)、30 μM のレスベラトロール、10 μM ϵ -ビニフェリン、400 μM の H_2O_2 を添加し、24 時間共存培養した。その後各時間の細胞の RNA を回収し、Real-time PCR 法により ICAM-1、VCAM-1 と E-セレクトインの mRNA レベルを解析した。(n=3, *P<0.05 vs. Untreated control, #P<0.05 vs. Control+)

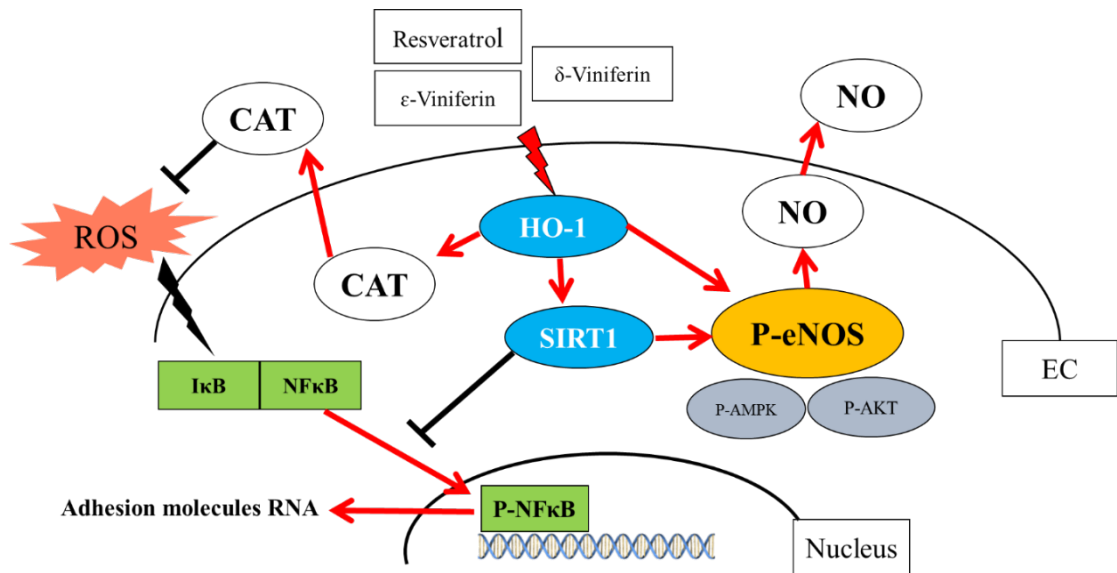


Fig. 3-16 内皮細胞におけるレスベラトロール、ε-ビニフェリン、およびδ-ビニフェリンの NO 産生および抗酸化能誘導に関する作用機序モデル

Table 1 本研究で用いた Real-time PCR 用プライマー

Genes		Base Sequences
ICAM	F	TCAATGGAACCGAGAAGGAG
	R	GGAGGTGGGAAGCTGTAGAA
VCAM	F	CAAGGAAACGAAGAGTTTGGA
	R	TGTTGTCTTTACTGAGGGCTGAC
E-SEL	F	AAAGTGGAGCCTGGTCTTACA
	R	CTCTGCTGGCAATAAGCACTG
18S	F	CTCCAATGGATCCTCGTTAAAGG
	R	CGGCTACCACATCCAAGGAA

第4章 総合討論

4 総合討論

本研究は、赤ワイン成分レスベラトロールとその二量体の ϵ -ビニフェリンおよび δ -ビニフェリンの 3 種の化合物に関し、血管内皮細胞に対する機能性を比較し、その作用機序の一端を明らかにした初めての研究である。フレンチ・パラドックスは、食文化と健康との関連を示す典型例としてよく知られている。すなわち、フランス人は乳製品や肉から脂肪をよく摂取するにもかかわらず、心筋梗塞などの虚血性心疾患の割合が他の西欧人より少ない、という矛盾である。フレンチ・パラドックスは、フランス人の赤ワインを摂取する習慣で説明されるが、特に赤ワイン中の機能性化合物としてレスベラトロールが有名である。しかし、レスベラトロールの赤ワイン中の含量を考えると、日常的な赤ワインの摂取量では説明がつかないとの反論も多い。本研究では、動脈硬化の発症・進展を抑制しうる血管内皮細胞への効果を指標に実験を行ったところ、レスベラトロールだけでなく、 ϵ -ビニフェリンや δ -ビニフェリンもレスベラトロール同様の効果があり、内皮細胞の創傷治癒効果については、レスベラトロールに比べて、より低濃度で効果を発揮するデータが得られた。このことは、レスベラトロールだけでなく、その二量体も赤ワインの健康効果に大きく貢献していることを意味している。ブドウの品種によりこれら 3 種の化合物の含量は異なり、また他の二量体、さらには三量体、四量体も存在する。従って、フレンチ・パラドックスへの赤ワインの関与については、レスベラトロールだけでなくその多量体を含め、総合的に考える必要があることを本研究は示すものである。

謝辞

本研究を行うにあたり、過分のご指導ならびにご援助を賜りました、筑波大学生命環境系・宮崎均教授に厚く御礼申し上げます。筑波大学生命環境系・吉田滋樹准教授には ϵ -ビニフェリンと δ -ビニフェリンを提供して頂きましたことを心より感謝いたします。また、ブタ胸部大動脈を提供して頂きました土浦食肉協同組合の皆様にも深く感謝いたします。また、ともに研究活動を行い、御助言、議論して頂きました宮崎研究室の皆様にも心から厚く御礼申し上げます。最後に、研究生生活を支え、暖かく励ましてくれた家族、友人にも心から感謝いたします。

引用文献

1. Quideau S, Deffieux D, Douat-Casassus C, Pouysegu L. Plant polyphenols: chemical properties, biological activities, and synthesis. *Angew Chem Int Ed Engl* 2011; **50**: 586-621.
2. Pandey KB, Rizvi SI. Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxid Med Cell Longev* 2009; **2**: 270-278.
3. Cueva C, Gil-Sánchez I, Ayuda-Durán B, et al. An Integrated View of the Effects of Wine Polyphenols and Their Relevant Metabolites on Gut and Host Health. *Molecules* 2017; **22**: 99.
4. Li A-N, Li S, Zhang Y-J, Xu X-R, Chen Y-M, Li H-B. Resources and biological activities of natural polyphenols. *Nutrients* 2014; **6**: 6020-6047.
5. Omodanisi E, Aboua Y, Oguntibeju O. Assessment of the Anti-Hyperglycaemic, Anti-Inflammatory and Antioxidant Activities of the Methanol Extract of Moringa Oleifera in Diabetes-Induced Nephrotoxic Male Wistar Rats. *Molecules* 2017; **22**: 439.
6. Nagulapalli Venkata KC, Swaroop A, Bagchi D, Bishayee A. A small plant with big benefits: Fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* Linn.) for disease prevention and health promotion. *Mol Nutr Food Res* 2017; **61**: 1600950.
7. Franceschelli S, Pesce M, Ferrone A, et al. Biological Effect of Licochalcone C on the Regulation of PI3K/Akt/eNOS and NF-kappaB/iNOS/NO Signaling Pathways in H9c2 Cells in Response to LPS Stimulation. *Int J Mol Sci* 2017; **18**: 690.
8. Sajid M, Khan MR, Shah SA, et al. Investigations on anti-inflammatory and analgesic activities of *Alnus nitida* Spach (Endl). stem bark in Sprague Dawley rats. *J Ethnopharmacol* 2017; **198**: 407-416.
9. Nobile V, Michelotti A, Cestone E, et al. Skin photoprotective and antiageing effects of a combination of rosemary (*Rosmarinus officinalis*) and grapefruit (*Citrus paradisi*) polyphenols. *Food Nutr Res* 2016; **60**: 31871.
10. Gamboa-Gomez CI, Gonzalez-Laredo RF, Gallegos-Infante JA, et al. Antioxidant and Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitory Activity of *Eucalyptus camaldulensis* and *Litsea glaucescens* Infusions Fermented with Kombucha Consortium. *Food Technol Biotechnol* 2016; **54**: 367-374.
11. Zghonda N, Yoshida S, Ezaki S, et al. epsilon-Viniferin is more effective than its monomer resveratrol in improving the functions of vascular endothelial cells and the heart. *Biosci Biotechnol Biochem* 2012; **76**: 954-960.
12. Tenore GC, Caruso D, Buonomo G, et al. A Healthy Balance of Plasma Cholesterol by a Novel Annurca Apple-Based Nutraceutical Formulation: Results of a Randomized Trial. *J Med Food* 2017; **20**: 288-300.
13. Jia M, Ren D, Nie Y, Yang X. Beneficial effects of apple peel polyphenols on vascular endothelial dysfunction and liver injury in high choline-fed mice. *Food Funct* 2017; **8**: 1282-1292.
14. Reboredo-Rodríguez P, Figueiredo-González M, González-Barreiro C, et al. State of the Art on

Functional Virgin Olive Oils Enriched with Bioactive Compounds and Their Properties. *Int J Mol Sci* 2017; **18**: 668.

15. Renaud S, de Lorgeril M. Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease. *Lancet (London, England)* 1992; **339**: 1523-1526.
16. Ulbricht TL, Southgate DA. Coronary heart disease: seven dietary factors. *Lancet* 1991; **338**: 985-992.
17. Ferrières J. The French paradox: lessons for other countries. *Heart* 2004; **90**: 107-111.
18. Wannamethee SG, Shaper AG. Type of alcoholic drink and risk of major coronary heart disease events and all-cause mortality. *Am J Public Health* 1999; **89**: 685-690.
19. Rimm EB, Klatsky A, Grobbee D, Stampfer MJ. Review of moderate alcohol consumption and reduced risk of coronary heart disease: is the effect due to beer, wine, or spirits. *BMJ* 1996; **312**: 731-736.
20. Cordova AC, Sumpio BE. Polyphenols are medicine: Is it time to prescribe red wine for our patients? *Int J Angiol* 2009; **18**: 111-117.
21. Catalgol B, Batirel S, Taga Y, Ozer N. Resveratrol: French Paradox Revisited. *Front Pharmacol* 2012; **3**:141.
22. Jeandet P, Bessis R, Maume B, Sbaghi M. Analysis of resveratrol in Burgundy wines. *J Wine Res* 1993; **4**: 79-85.
23. Reaven GM. Role of Insulin Resistance in Human Disease. *Diabetes* 1988; **37**: 1595.
24. Isomaa B, Almgren P, Tuomi T, et al. Cardiovascular morbidity and mortality associated with the metabolic syndrome. *Diabetes Care* 2001; **24**: 683-689.
25. Park YW, Zhu S, Palaniappan L, Heshka S, Carnethon MR, Heymsfield SB. The metabolic syndrome: prevalence and associated risk factor findings in the US population from the Third National Health and Nutrition Examination Survey, 1988-1994. *Arch Intern Med* 2003; **163**: 427-436.
26. Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III) final report. *Circulation* 2002; **106**: 3143-3421.
27. Balkau B, Charles MA, Drivsholm T, et al. Frequency of the WHO metabolic syndrome in European cohorts, and an alternative definition of an insulin resistance syndrome. *Diabetes Metab* 2002; **28**: 364-376.
28. Arai H, Yamamoto A, Matsuzawa Y, et al. Prevalence of metabolic syndrome in the general Japanese population in 2000. *J Atheroscler Thromb* 2006; **13**: 202-208.
29. Alshehri AM. Metabolic syndrome and cardiovascular risk. *J Family Community Med* 2010; **17**: 73-78.
30. Wilson PW, D'Agostino RB, Parise H, Sullivan L, Meigs JB. Metabolic syndrome as a precursor of cardiovascular disease and type 2 diabetes mellitus. *Circulation* 2005; **112**: 3066-3072.
31. Lonardo A, Nascimbeni F, Mantovani A, Targher G. Hypertension, diabetes, atherosclerosis and NASH: Cause or consequence? *J Hepatol* 2018; **68**: 335-352.

32. Pugsley MK, Tabrizchi R. The vascular system: An overview of structure and function. *J Pharmacol Toxicol Methods* 2000; **44**: 333-340.
33. Baselet B, Rombouts C, Benotmane AM, Baatout S, Aerts A. Cardiovascular diseases related to ionizing radiation: The risk of low-dose exposure (Review). *Int J Mol Med* 2016; **38**: 1623-1641.
34. Galkina E, Ley K. Immune and inflammatory mechanisms of atherosclerosis (*). *Annu Rev Immunol* 2009; **27**: 165-197.
35. Heiss C, Rodriguez-Mateos A, Kelm M. Central role of eNOS in the maintenance of endothelial homeostasis. *Antioxid Redox Signal* 2015; **22**: 1230-1242.
36. Kubota T, Kubota N, Kumagai H, et al. Impaired insulin signaling in endothelial cells reduces insulin-induced glucose uptake by skeletal muscle. *Cell Metab* 2011; **13**: 294-307.
37. Siemann EH, Creasy LL. Concentration of the Phytoalexin Resveratrol in Wine. 1992; **43**: 49-52.
38. Pezet R, Gindro K, Viret O, Richter H. Effects of resveratrol, viniferins and pterostilbene on *Plasmopara viticola* zoospore mobility and disease development. *Vitis* 2004; **43**: 145-148.
39. Cantos E, Espin JC, Tomas-Barberan FA. Postharvest induction modeling method using UV irradiation pulses for obtaining resveratrol-enriched table grapes: a new "functional" fruit? *J Agric Food Chem* 2001; **49**: 5052-5058.
40. Lambert C, Richard T, Renouf E, et al. Comparative analyses of stilbenoids in canes of major *Vitis vinifera* L. cultivars. *J Agric Food Chem* 2013; **61**: 11392-11399.
41. Spanier G, Xu H, Xia N, et al. Resveratrol reduces endothelial oxidative stress by modulating the gene expression of superoxide dismutase 1 (SOD1), glutathione peroxidase 1 (GPx1) and NADPH oxidase subunit (Nox4). *J Physiol Pharmacol* 2009; **60 Suppl 4**: 111-116.
42. Liu Y, Liu G. Isorhapontigenin and resveratrol suppress oxLDL-induced proliferation and activation of ERK1/2 mitogen-activated protein kinases of bovine aortic smooth muscle cells. *Biochem Pharmacol* 2004; **67**: 777-785.
43. Wallerath T, Deckert G, Ternes T, et al. Resveratrol, a polyphenolic phytoalexin present in red wine, enhances expression and activity of endothelial nitric oxide synthase. *Circulation* 2002; **106**: 1652-1658.
44. Wood JG, Rogina B, Lavu S, et al. Sirtuin activators mimic caloric restriction and delay ageing in metazoans. *Nature* 2004; **430**: 686-689.
45. Baur JA, Pearson KJ, Price NL, et al. Resveratrol improves health and survival of mice on a high-calorie diet. *Nature* 2006; **444**: 337-342.
46. Zhang QJ, Wang Z, Chen HZ, et al. Endothelium-specific overexpression of class III deacetylase SIRT1 decreases atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Cardiovasc. Res* 2008; **80**: 191-199.
47. Ota H, Eto M, Kano MR, et al. Induction of endothelial nitric oxide synthase, SIRT1, and catalase by statins inhibits endothelial senescence through the Akt pathway. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2010; **30**: 2205-2211.
48. Zhang W, Huang Q, Zeng Z, Wu J, Zhang Y, Chen Z. Sirt1 Inhibits Oxidative Stress in Vascular

- Endothelial Cells. *Oxid Med Cell Longev* 2017; **2017**: 7543973.
49. Stein S, Matter CM. Protective roles of SIRT1 in atherosclerosis. *Cell Cycle* 2011; **10**: 640-647.
 50. Stein S, Schafer N, Breitenstein A, et al. SIRT1 reduces endothelial activation without affecting vascular function in ApoE^{-/-} mice. *Aging* 2010; **2**: 353-630.
 51. Kim I, Moon SO, Kim SH, Kim HJ, Koh YS, Koh GY. Vascular endothelial growth factor expression of intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1), vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1), and E-selectin through nuclear factor-kappa B activation in endothelial cells. *J Biol Chem* 2001; **276**: 7614-7620.
 52. Langcake P, Pryce RJ. A new class of phytoalexins from grapevines. *Experientia* 1977; **33**: 151-152.
 53. Langcake P, Pryce RJ. Oxidative dimerisation of 4-hydroxystilbenes in vitro: production of a grapevine phytoalexin mimic. *J Chem Soc, Chem Commun* 1977; **7**: 208-210.
 54. Vitrac X, Bornet A, Vanderlinde R, et al. Determination of stilbenes (delta-viniferin, trans-astringin, trans-piceid, cis- and trans-resveratrol, epsilon-viniferin) in Brazilian wines. *J Agric Food Chem* 2005; **53**: 5664-5669.
 55. Wilkens A, Paulsen J, Wray V, Winterhalter P. Structures of two novel trimeric stilbenes obtained by horseradish peroxidase catalyzed biotransformation of trans-resveratrol and (-)-epsilon-viniferin. *J Agric Food Chem* 2010; **58**: 6754-6761.
 56. Zghonda N, Yoshida S, Araki M, et al. Greater effectiveness of epsilon-viniferin in red wine than its monomer resveratrol for inhibiting vascular smooth muscle cell proliferation and migration. *Biosci Biotechnol Biochem* 2011; **75**: 1259-1267.
 57. Ohara K, Kusano K, Kitao S, Yanai T, Takata R, Kanauchi O. epsilon-Viniferin, a resveratrol dimer, prevents diet-induced obesity in mice. *Biochem Biophys Res Commun* 2015; **468**: 877-882.
 58. Fu J, Jin J, Cichewicz RH, et al. trans(-)-epsilon-Viniferin increases mitochondrial sirtuin 3 (SIRT3), activates AMP-activated protein kinase (AMPK), and protects cells in models of Huntington Disease. *J Biol Chem* 2012; **287**: 24460-24472.
 59. Caillaud M, Guillard J, Richard D, et al. Trans epsilon viniferin decreases amyloid deposits and inflammation in a mouse transgenic Alzheimer model. *PLoS One* 2019; **14**: e0212663.
 60. Zhao H, Ma T, Fan B, et al. Protective effect of trans-delta-viniferin against high glucose-induced oxidative stress in human umbilical vein endothelial cells through the SIRT1 pathway. *Free Radic Res* 2016; **50**: 68-83.
 61. Ficarra S, Tellone E, Pirolli D, et al. Insights into the properties of the two enantiomers of trans-delta-viniferin, a resveratrol derivative: antioxidant activity, biochemical and molecular modeling studies of its interactions with hemoglobin. *Mol Biosyst* 2016; **12**: 1276-1286.
 62. Kikuchi G, Yoshida T, Noguchi M. Heme oxygenase and heme degradation. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; **338**: 558-567.
 63. Morita T. Heme oxygenase and atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005; **25**: 1786-1795.

64. Loboda A, Damulewicz M, Pyza E, Jozkowicz A, Dulak J. Role of Nrf2/HO-1 system in development, oxidative stress response and diseases: an evolutionarily conserved mechanism. *Cell Mol Life Sci* 2016; **73**: 3221-3247.
65. Abraham NG, Junge JM, Drummond GS. Translational Significance of Heme Oxygenase in Obesity and Metabolic Syndrome. *Trends Pharmacol Sci* 2016; **37**: 17-36.
66. Otterbein LE, Bach FH, Alam J, et al. Carbon monoxide has anti-inflammatory effects involving the mitogen-activated protein kinase pathway. *Nat Med* 2000; **6**: 422-428.
67. Sass G, Soares MC, Yamashita K, et al. Heme oxygenase-1 and its reaction product, carbon monoxide, prevent inflammation-related apoptotic liver damage in mice. *Hepatology* 2003; **38**: 909-918.
68. Brouard S, Otterbein LE, Anrather J, et al. Carbon Monoxide Generated by Heme Oxygenase 1 Suppresses Endothelial Cell Apoptosis. *J Exp Med* 2000; **192**: 1015-1026.
69. Maccarinelli F, Gammella E, Asperti M, et al. Mice lacking mitochondrial ferritin are more sensitive to doxorubicin-mediated cardiotoxicity. *J Mol Med* 2014; **92**: 859-869.
70. Yunoki K, Inoue T, Sugioka K, et al. Association between hemoglobin scavenger receptor and heme oxygenase-1-related anti-inflammatory mediators in human coronary stable and unstable plaques. *Hum Pathol* 2013; **44**: 2256-2265.
71. Troughton JA, Woodside JV, Young IS, et al. Homocysteine and coronary heart disease risk in the PRIME study. *Atherosclerosis* 2007; **191**: 90-97.
72. Clark JE, Foresti R, Sarathchandra P, Kaur H, Green CJ, Motterlini R. Heme oxygenase-1-derived bilirubin ameliorates postischemic myocardial dysfunction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2000; **278**: H643-651.
73. Jarmi T, Agarwal A. Heme oxygenase and renal disease. *Curr Hypertens Rep* 2009; **11**: 56-62.
74. Neuzil J, Stocker R. Free and albumin-bound bilirubin are efficient co-antioxidants for alpha-tocopherol, inhibiting plasma and low density lipoprotein lipid peroxidation. *J Biol Chem* 1994; **269**: 16712-16719.
75. Mazza F, Goodman A, Lombardo G, Vanella A, Abraham NG. Heme Oxygenase-1 Gene Expression Attenuates Angiotensin II-Mediated DNA Damage in Endothelial Cells. *Exp Biol Med* 2003; **228**: 576-583.
76. Liu VWT, Huang PL. Cardiovascular roles of nitric oxide: a review of insights from nitric oxide synthase gene disrupted mice. *Cardiovasc Res* 2008; **77**: 19-29.
77. Chen C-A, Druhan LJ, Varadharaj S, Chen Y-R, Zweier JL. Phosphorylation of endothelial nitric-oxide synthase regulates superoxide generation from the enzyme. *J Biol Chem* 2008; **283**: 27038-27047.
78. Eroglu E, Saravi SSS, Sorrentino A, Steinhorn B, Michel T. Discordance between eNOS phosphorylation and activation revealed by multispectral imaging and chemogenetic methods. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2019; **116**: 20210.
79. Xia Y, Zweier JL. Superoxide and peroxynitrite generation from inducible nitric oxide synthase

- in macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; **94**: 6954-6958.
80. Somers JR, Beck PL, Lees-Miller JP, et al. iNOS in cardiac myocytes plays a critical role in death in a murine model of hypertrophy induced by calcineurin. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2008; **295**: H1122-H1131.
81. Chowdhury N, Tisha A, Sarker J, et al. Targeting inducible Nitric Oxide Synthase (iNOS) in the prevention of vascular damage and cardiac inflammation in CVD. *J. Angiotherapy* 2018; **1**: E067-E077.
82. Xia XD, Xu ZJ, Hu XG, Wu CY, Dai YR, Yang L. Impaired iNOS-sGC-cGMP signalling contributes to chronic hypoxic and hypercapnic pulmonary hypertension in rat. *Cell Biochem Funct* 2012; **30**: 279-285.
83. Hillis GS, Flapan AD. Cell adhesion molecules in cardiovascular disease: a clinical perspective. *Heart* 1998; **79**: 429-431.
84. Cybulsky MI, Iiyama K, Li H, et al. A major role for VCAM-1, but not ICAM-1, in early atherosclerosis. *J Clin Invest* 2001; **107**: 1255-1262.
85. Giridharan S, Srinivasan M. Mechanisms of NF- κ B p65 and strategies for therapeutic manipulation. *J Inflamm Res* 2018; **11**: 407-419.
86. Morgan MJ, Liu Z-g. Crosstalk of reactive oxygen species and NF- κ B signaling. *Cell Res* 2011; **21**: 103-115.
87. Xia Y-F, Liu L-P, Zhong C-P, Geng J-G. NF- κ B Activation for Constitutive Expression of VCAM-1 and ICAM-1 on B Lymphocytes and Plasma Cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; **289**: 851-856.
88. Lockyer JM, Colladay JS, Alperin-Lea WL, Hammond T, Buda AJ. Inhibition of nuclear factor-kappaB-mediated adhesion molecule expression in human endothelial cells. *Circ Res* 1998; **82**: 314-320.
89. Soares MP, Seldon MP, Gregoire IP, et al. Heme oxygenase-1 modulates the expression of adhesion molecules associated with endothelial cell activation. *J Immunol* 2004; **172**: 3553-3563.
90. Kim S-R, Bae Y-H, Bae S-K, et al. Visfatin enhances ICAM-1 and VCAM-1 expression through ROS-dependent NF- κ B activation in endothelial cells. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res* 2008; **1783**: 886-895.
91. Poznyak AV, Grechko AV, Orekhova VA, Chegodaev YS, Wu W-K, Orekhov AN. Oxidative Stress and Antioxidants in Atherosclerosis Development and Treatment. *Biology* 2020; **9**: 60.
92. Lingappan K. NF- κ B in Oxidative Stress. *Curr Opin Toxicol* 2018; **7**: 81-86.
93. Planas JM, Alfaras I, Colom H, Juan ME. The bioavailability and distribution of trans-resveratrol are constrained by ABC transporters. *Arch Biochem Biophys* 2012; **527**: 67-73.
94. Walle T. Bioavailability of resveratrol. *Ann N Y Acad Sci* 2011; **1215**: 9-15.
95. Semba RD, Ferrucci L, Bartali B, et al. Resveratrol Levels and All-Cause Mortality in Older Community-Dwelling Adults. *JAMA Intern Med* 2014; **174**: 1077-1084.
96. Berman AY, Motechin RA, Wiesenfeld MY, Holz MK. The therapeutic potential of resveratrol: a

- review of clinical trials. *NPJ Precis Oncol* 2017; **1**: 35.
97. Liu Q, Liao X, Xu J, Zhao J, Luo J, Kong L. Development and validation of a sensitive and selective LC–MS/MS method for the determination of trans δ -veniferin, a resveratrol dehydrodimer, in rat plasma and its application to pharmacokinetics and bioavailability studies. *J Chromatogr B* 2014; **958**: 124-129.
98. Bb áková L, Trávníková M, Filova E, et al. The Role of Vascular Smooth Muscle Cells in the Physiology and Pathophysiology of Blood Vessels. 2018; **2018**: 230-257.
99. Lee S, Park Y, Zuidema MY, Hannink M, Zhang C. Effects of interventions on oxidative stress and inflammation of cardiovascular diseases. *World J Cardiol* 2011; **3**: 18-24.
100. Xia N, Forstermann U, Li H. Resveratrol and endothelial nitric oxide. *Molecules* 2014; **19**: 16102-16121.
101. Michell B, Chen Z-p, Tiganis T, et al. Coordinated Control of Endothelial Nitric-oxide Synthase Phosphorylation by Protein Kinase C and the cAMP-dependent Protein Kinase. *J Biol Chem* 2001; **276**: 17625-17628.
102. Mattagajasingh I, Kim CS, Naqvi A, et al. SIRT1 promotes endothelium-dependent vascular relaxation by activating endothelial nitric oxide synthase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; **104**: 14855-14860.
103. Cai H. Hydrogen peroxide regulation of endothelial function: origins, mechanisms, and consequences. *Cardiovasc Res* 2005; **68**: 26-36.
104. Lee S, Chung J, Ha IS, et al. Hydrogen peroxide increases human leukocyte adhesion to porcine aortic endothelial cells via NFkappaB-dependent up-regulation of VCAM-1. *Int Immunol* 2007; **19**: 1349-1359.
105. Li Q, Verma IM. NF-kappaB regulation in the immune system. *Nat Rev Immunol* 2002; **2**: 725-734.
106. Gilmore TD. The Rel/NF-kappaB signal transduction pathway: introduction. *Oncogene* 1999; **18**: 6842-6844.
107. Noiri E, Lee E, Testa J, et al. Podokinesis in endothelial cell migration: role of nitric oxide. *Am J Physiol* 1998; **274**: C236-244.
108. Luo JD, Wang YY, Fu WL, Wu J, Chen AF. Gene therapy of endothelial nitric oxide synthase and manganese superoxide dismutase restores delayed wound healing in type 1 diabetic mice. *Circulation* 2004; **110**: 2484-2493.
109. Sodhi K, Puri N, Favero G, et al. Fructose Mediated Non-Alcoholic Fatty Liver Is Attenuated by HO-1-SIRT1 Module in Murine Hepatocytes and Mice Fed a High Fructose Diet. *PLoS One* 2015; **10**: e0128648.
110. Luo W, Wang Y, Yang H, et al. Heme oxygenase-1 ameliorates oxidative stress-induced endothelial senescence via regulating endothelial nitric oxide synthase activation and coupling. *Aging* 2018; **10**: 1722-1744.
111. Liu X-m, Peyton KJ, Shebib AR, Wang H, Korthuis RJ, Durante W. Activation of AMPK

stimulates heme oxygenase-1 gene expression and human endothelial cell survival. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2011; **300**: H84-H93.

112. Luo Y, Lu S, Ai Q, et al. SIRT1/AMPK and Akt/eNOS signaling pathways are involved in endothelial protection of total aralosides of *Aralia elata* (Miq) Seem against high-fat diet-induced atherosclerosis in ApoE^{-/-} mice. *Phytother Res* 2019; **33**: 768-778.

113. David JA, Rifkin WJ, Rabbani PS, Ceradini DJ. The Nrf2/Keap1/ARE Pathway and Oxidative Stress as a Therapeutic Target in Type II Diabetes Mellitus. *J Diabetes Res* 2017; **2017**: 4826724.

114. Nguyen PA, Won JS, Rahman MK, Bae EJ, Cho MK. Modulation of Sirt1/NF- κ B interaction of evogliptin is attributed to inhibition of vascular inflammatory response leading to attenuation of atherosclerotic plaque formation. *Biochem Pharmacol* 2019; **168**: 452-464.

115. Chi P-L, Chuang Y-C, Chen Y-W, Lin C-C, Hsiao L-D, Yang C-M. The CO donor CORM-2 inhibits LPS-induced vascular cell adhesion molecule-1 expression and leukocyte adhesion in human rheumatoid synovial fibroblasts. *Br J Pharmacol* 2014; **171**: 2993-3009.

116. Nakamura K, Kageyama S, Yue S, et al. Heme oxygenase-1 regulates sirtuin-1-autophagy pathway in liver transplantation: From mouse to human. *Am J Transplant* 2018; **18**: 1110-1121.

117. Lakhani HV, Zehra M, Pillai SS, et al. Beneficial Role of HO-1-SIRT1 Axis in Attenuating Angiotensin II-Induced Adipocyte Dysfunction. *Int J Mol Sci* 2019; **20**: 3205.

118. Jung TW, Park HS, Jeong JH, Lee T. Salsalate ameliorates the atherosclerotic response through HO-1- and SIRT1-mediated suppression of ER stress and inflammation. *Inflamm Res* 2019; **68**: 655-663.