

パッションフルーツ種子に含まれるポリフェノール  
Piceatannol に関する機能性研究

2018 年 1 月

内田 裕子

パッションフルーツ種子に含まれるポリフェノール  
Piceatannol に関する機能性研究

筑波大学大学院  
生命環境科学研究科  
生命産業科学専攻  
博士(農学)学位論文

内田 裕子

目次	
概要	1
第一章 緒言	4
第二章 Piceatannol およびパッションフルーツ種子エキスの角化細胞への効果	
第一節 背景および目的	10
第二節 実験方法	13
2-2-1 材料	13
2-2-2 UVB 照射	13
2-2-3 サンプル調製(PFSE, piceatannol, scirpusin B)	14
2-2-4 GSH 量	14
2-2-5 細胞内 ROS 測定	15
2-2-6 MMP-1 assay	16
2-2-7 統計解析	17
第三節 結果	18
2-3-1 パッションフルーツ種子エキスの角化細胞のグルタチオン量への影響	18
2-3-2 パッションフルーツ種子エキスの角化細胞の UVB 誘導 ROS 産生への影響	18
2-3-3 Piceatannol の UVB 照射 keratinocyte-conditioned medium 処理線維芽細胞の MMP-1 活性化に与える間接的影響	19
第四節 考察	21
第三章 Piceatannol およびパッションフルーツ種子エキスによる血糖値への効果	
第一節 背景および目的	29
第二節 実験方法	31
3-2-1 材料	31
3-2-2 PFSE の調製	31
3-2-3 HFD マウスへの piceatannol の影響	31
3-2-4 糖尿病マウスへの PFSE や piceatannol の血糖への影響	32
3-2-5 統計解析	33

3-2-6 動物実験倫理.....	34
第三節 結果.....	35
3-3-1 Piceatannol の HFD マウスへの影響.....	35
3-3-2 PFSE の <i>db/db</i> マウスへの影響.....	36
第四節 考察.....	37
第四章 Piceatannol 高含有パッションフルーツ種子エキスによるラットの血 管や肝臓への効果	
第一節 背景および目的.....	46
第二節 実験方法.....	48
4-2-1 PFSE の調製と分析.....	48
4-2-2 ラット、実験食、PFSE 添加.....	48
4-2-3 血液と組織回収.....	49
4-2-4 血清分析.....	49
4-2-5 血小板凝集能分析.....	49
4-2-6 組織学.....	50
4-2-7 ドブタミン負荷心エコー.....	51
4-2-8 血管反応性測定.....	51
4-2-9 統計解析.....	52
4-2-10 動物実験倫理.....	52
第三節 結果.....	54
4-3-1 摂餌量、体重、組織重量.....	54
4-3-2 代謝パラメーター、血小板凝集能.....	54
4-3-3 肝臓の構造.....	55
4-3-4 心臓の機能.....	56
4-3-5 血管反応性.....	56
第四節 考察.....	58
第五章 総括.....	71
参考文献.....	79
謝辞	

## 略語

ADP	adenosine diphosphate アデノシン二リン酸
ALT	alanine aminotransferase
AMPK	AMP-activated protein kinase
AST	aspartate aminotransferase
BCA	bicinchoninic acid
BG	1,3-butylene glycol
CHO	cholesterol
CMC	carboxymethyl cellulose
EGCG	epigallocatechin gallate
ELISA	enzyme-linked immunoassay
eNOS	endothelial nitric oxide synthase
F344 rats	Fischer 344 rats
FS	fractional shortening 左心室内径短縮率
GSH	glutathione グルタチオン
H <sub>2</sub> DCFDA	dichlorodihydrofluorescein diacetate
H&E	hematoxylin and eosin
HFD	high fat diet 高脂肪食
HPLC	high-performance liquid chromatography
JAK1	janus kinase 1
LDL-	low-density lipoprotein-
LVEsD	left ventricular end-systolic dimensions 収縮期心室内径
MMP	matrix metalloproteinase
NF- $\kappa$ B	nuclear factor-kappa B
ODS	octa decyl silyl
PFSE	passion fruit seed extract パッションフルーツ種子エキス
PPAR	peroxisome proliferator-activated receptor
ROS	reactive oxygen species 活性酸素種
SD	standard deviation
SEM	standard error of the mean
SIRT	sirtuin

Syk	spleen tyrosine kinase
TG	triglyceride 中性脂肪
UVB	ultraviolet B 紫外線 B 波
vs.	versus

## 概要

Piceatannol はスチルベン骨格のポリフェノールで、resveratrol に水酸基が1つ結合した構造をしている。Resveratrol はブドウ皮中に豊富に含まれ、フレンチパラドックス(フランス人は動物性脂肪の摂取率が高いにもかかわらず、心臓病の死亡率が低いという疫学研究)と関連した心血管疾患保護作用や代謝性疾患改善作用、寿命延長作用などが報告されている一方で、piceatannol は植物中の含量が低く、あまり研究が進んでいなかった。これまで、piceatannol がパッションフルーツ種子中に豊富に含まれていることを見出し、piceatannol を豊富に含んだパッションフルーツ種子エキス (passion fruit seed extract : PFSE) の製造を可能にした。パッションフルーツは種ごと果肉を食することから、食経験もあると考えられた。そこで研究を進めた結果、piceatannol は *in vitro* や細胞で resveratrol に劣らない様々な生理活性を示すこと、ラットでの吸収検討により piceatannol は resveratrol に比べ未変化体の形で2倍吸収されることがわかった。これらの結果から、piceatannol や piceatannol を豊富に含む PFSE は resveratrol に匹敵する機能性食品になりうると考えられたので、ヒトでの有効性検証につながる動物実験と、化粧品への応用を想定した角化細胞への作用検討を行うことを本研究の目的とした。

最初にヒト角化細胞への作用を検討した。その結果、PFSE や piceatannol の添加が、角化細胞で抗酸化物質グルタチオンの発現を誘導することがわかった。また、ultraviolet B (UVB) の照射で増加した場合にも、未照射の場合にも、細胞内の活性酸素種の生成を抑制することもわかった。そして、piceatannol は間接的に誘導される線維芽細胞でのコラーゲン分解酵素の活性も抑制することがわかった。

次に、動物を用いた検討を行った。代謝に与える影響を検討するために、C57BL/6Jcl マウスに高脂肪食負荷を行うとともに piceatannol を 5 週間経口投与したところ、コントロール食と比べ、高脂肪食負荷により体重や脂肪量は増加したが、piceatannol の投与による変化は見られなかった。ただ、血糖値のみ低下することがわかった。そこで、肥満誘導 II 型糖尿病モデルである *db/db* マウスに PFSE を単回投与した結果、同様に随時血糖の低下が見られた。

最後に、心血管に与える影響を検討するために、Fisher 344 ラットに piceatannol (9.5% w/w) を含む PFSE を高脂肪食の負荷と同時に 4 ヶ月混餌 (0.5%) 摂取させた。その結果、コントロール食を与えたマウスと比べ、高脂肪食負荷によって、ラットは血清パラメーター (コレステロール、中性脂肪、ALT、AST) の悪化とともに、心血管疾患の兆候を示した。一方 PFSE の投与は、高脂肪食負荷で見られた肝臓の肥大や組織学的変化を改善した。加えて、血小板凝集能の上昇、心機能の



低下、acetylcholine 誘導の血管弛緩の減弱も改善した。ただ PFSE の投与は体重には影響を与えず、脂肪量に関してはむしろ増加した。

以上の結果から、piceatannol を豊富に含む PFSE は抗酸化活性の誘導により UVB によるダメージから肌を保護すること、瘦身効果はないものの肥満による血糖値の上昇を抑制すること、血管や肝臓の保護によって心血管疾患を予防することが示唆された。これらの研究は、piceatannol の新たな機能性を明らかにするとともに、今後の PFSE の化粧品への応用やヒトでの効果検討につながるものと考えられた。

## 第一章 緒言

高齢化社会が進み、健康寿命延長への関心が高まっている。疾病を治療する薬ではなく、健康維持に重要な役割を果たす食品の重要性は今後ますます高まると考えられる。老化の原因については、学説が多くあるが、Harmanらが1956年に唱えたフリーラジカル説は酸化ストレス説に形を変え、現在も有力な説である[1]。実際、近年明らかとなっているモデル動物の変異体による寿命の変化は、酸化ストレス感受性と関連している。また、reactive oxygen species (ROS) が生体内で脂質・タンパク質・DNAなどの高分子に酸化ダメージを与えること、酸化還元感受性の高い酵素の活性化や不活性化から多くのシグナル変化を引き起こし、代謝性疾患、心疾患、神経変性など様々な疾患の原因になっていることも明らかとなっている[2]。

ポリフェノールは、厳しい外部環境にさらされる植物が酸化ストレス防御のために作り出している物質で、強い抗酸化能を発揮する[3]。そのため、ポリフェノールを摂取することで、生体内の酸化ストレスを抑え、老化を抑えることが可能だと考えられる。また、直接的な抗酸化力だけではなく、酸化促進剤として働き、細胞内の抗酸化防御システムを誘導することで抗酸化能を発揮する作用も報告されている[4]。実際に、疫学研究や、複数の研究結果を統合しより高い見地から分析するメタ解析から、ポリフェノールを豊富に含む食事の長期間の摂取は、抗酸化能の寄与度は不明なものの、癌、心血

管疾患、糖尿病、骨粗しょう症、神経変性疾患などに対して保護を示すことが明らかとなっており[5, 6]、ポリフェノールが示す様々な生理活性に対する研究が進んできた。

ポリフェノールは構造によっていくつかの種類に分けられる。まず、大きくはフラバンを基本骨格とするフラボノイド類と非フラボノイド類に分けられ、フラボノイド類は、フラボン（アピゲニン、ルテオリン:パセリ、エゴマ）、フラボノール（ケルセチン、ルチン:タマネギ、蕎麦）、フラバノン（ナリンゲニン、ヘスペリジン:かんきつ類）、フラバノール（カテキン、エピカテキン:緑茶、ココア）、アントシアニン（シアニジン、デルフィニジン:ブドウ、ブルーベリー）、イソフラボン（ダイジン、ゲニステイン:大豆）などがある。非フラボノイドにはタンニン（テアフラビン:紅茶、ウーロン茶）、フェノール酸（カフェ酸、クロロゲン酸:コーヒー）、リグナン（セサミン、セサミノール:ゴマ）、クルクミン（クルクミン、ショウガオール:ウコン、生姜）、スチルベン（レスベラトロール:ブドウ、ベリー、ピーナッツ）などがある。また重合したポリマーポリフェノール（タンニン）もあり、そちらは縮合型（プロアントシアニジン:樹皮、ブドウ種子）、加水分解型（ガロタンニン、エラグタンニン:アムラ、甜茶）に分けられる。ポリフェノールは種類によって主に含まれる食品もまた異なり[7]、抗酸化能など共通する活性もあるものの、種類によって特徴的な活性もある。

赤ワインに含まれる resveratrol (*trans*-3,4',5-trihydroxystilbene) はフレンチパラドックスの関与成分と言われ[8, 9]、多くの心血管疾患保護作用が報告されている。

他にも、resveratrol は 2003 年にカロリー制限と同様に Sir2 (sirtuin (SIRT) 1 の相同分子種) を活性化して酵母の寿命を延長する化合物として注目を浴びた[10]。その他にも SIRT や AMP-activated protein kinase (AMPK) 活性化を介した代謝性疾患改善[11-15]、抗癌[16]、脳変性疾患改善[17]、など様々な作用が報告されている。

寿命延長は古くからの人々の願いであるが、カロリー制限による健康寿命延長効果が酵母からサルまで広く報告されてきている[18]。メカニズムとしては、カロリー制限によって SIRT1 が活性化されること[19]、逆に SIRT1 transgenic マウスがカロリー制限のような症状を示すことが報告されており[20]、SIRT1 活性化がカロリー制限による健康寿命延長に役割を果たしていると考えられる。Resveratrol が直接的に SIRT を活性化するかは議論の余地があるが、SIRT 活性化を介して多くの機能性を発揮していることが報告されている[21]。そのため、resveratrol は心血管疾患保護や健康寿命延長の食品として用いられており、臨床試験も多く行われている。プラセボコントロールの無作為二重盲検ヒト臨床試験では、II 型糖尿病患者でのインスリン抵抗性改善、癌患者での caspase3 切断の増加、健常人での脳血流増加・認知機能改善、健常人や心血管疾患患者での血管機能の改善といった報告がされている[22, 23]。

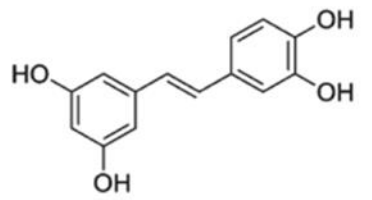
Piceatannol は同じスチルベン骨格のポリフェノールで、resveratrol に一つ OH 基が結合した形をしており (Figure 1-1) 、resveratrol よりも高い抗酸化活性や

spleen tyrosine kinase (Sky) 阻害活性が報告されている[24, 25]。Resveratrol より高い血管弛緩作用や resveratrol に劣るものの Sir2 の活性化作用も報告されている[10, 26]が、植物中での含量が低くこれまであまり研究が進んでいなかった。これまでに、パッションフルーツ (*Passiflora edulis*) の種の中に piceatannol が豊富に含まれていることを見出し[27]、piceatannol 含量の高い種子エキスの製造を可能にした。また resveratrol に比べ安定性の低い piceatannol の安定化も可能にした。

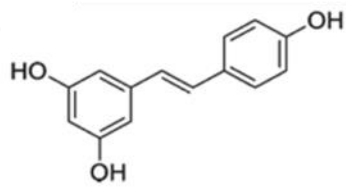
パッションフルーツは南米原産のつる性多年草で、種を含む半透明のゼリー状の果肉がそのまま食されており、種子エキスは食経験のある健康食品となると考えられた。そこで、piceatannol や piceatannol を豊富に含むパッションフルーツ種子エキス (PFSE) に関する研究を進め、線維芽細胞でのコラーゲン合成促進作用、メラニン生成細胞でのメラニン合成阻害作用、*ex vivo* での血管弛緩作用、内皮細胞での endothelial nitric oxide synthase (eNOS) の活性誘導作用、単球細胞での SIRT1 誘導作用[27-30]などを見出した。また、piceatannol が活性を発揮するためには経口摂取後の血中未変化濃度が重要と考え、その吸収性を resveratrol と比較して検討した。その結果、piceatannol の方が resveratrol に比べ未変化体の吸収が曲線下面積で2倍ほど高いこと、resveratrol の代謝物は排出されやすい抱合体が主であるのに対し、piceatannol では機能を有するメチル化体が検出されることがわかった[31]。これらの結果から、piceatannol や piceatannol を豊富に含む PFSE は

resveratrol に劣らない健康維持・増進に貢献できる食品素材となる可能性が考えられた。

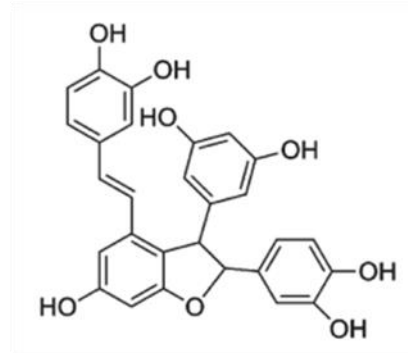
一方、piceatannol や piceatannol を豊富に含む PFSE の化粧品への応用を考えた場合には、塗布を想定した表皮角化細胞への作用検討が必要だと考えられた。また、健康食品への応用を考えた場合には、ヒトでの評価が必要であり、piceatannol は動物での評価報告がほとんどなかったため、動物での作用検討が必要だと考えられた。そこで私は、まず piceatannol やその二量体 scirpusin B、そしてそれらを含む PFSE が角化細胞に与える影響を検討した。次に、動物での代謝への影響を検討するために、piceatannol が高脂肪食負荷マウスに与える影響を検討し、その結果から、piceatannol や PFSE が *db/db* マウスの血糖に与える影響を検討した。最後に、動物での心血管への影響を検討するために、piceatannol を豊富に含む PFSE が高脂肪食負荷ラットに与える影響を検討した。



Piceatannol



Resveratrol



Scirpusin B

Figure 1-1. Chemical structures of piceatannol, resveratrol, and scirpusin B, a dimer of piceatannol.

## 第二章 Pieatannol およびパッションフルーツ種子エキスの角化細胞への効果

### 第一節

#### 背景および目的

太陽からの UV 照射は人の肌を傷害し、時期早尚の老化を引き起こす。この早期の老化プロセスは光老化と呼ばれ、表皮のしわやメラニン合成の増加によるしみなどで特徴づけられる[32-34]。一方、内因性の老化は弾力の低下や代謝の低下などに起因しておこる真皮の衰えで特徴づけられる[35-39]。

光老化による表皮のしわは、皮膚の主構成要素であるコラーゲンの無秩序による。皮膚のコラーゲンは主に真皮の線維芽細胞で合成され、角化細胞、線維芽細胞、炎症細胞などから分泌された matrix-metalloproteinases (MMPs) により分解される[33, 39, 40]。UV 照射、特に UVB (290-320 nm) や UVA (315-400 nm) の照射は老化過程での皮膚のコラーゲン分解を主に担っている線維芽細胞で MMP-1 の発現を誘導することがわかっている。そのため、UV により誘導された MMP-1 が結合組織のダメージに実質的に貢献し、光老化の間にコラーゲン欠損やしわなどを引き起こしていると考えられている[33, 39]。角化細胞は UVB 照射で MMP-1 を分泌しないものの、UV ダメージを受けた角化細胞は、サイトカインを分泌することで間接的に線維



芽細胞での MMP-1 の放出に重要な役割を果たす。線維芽細胞への直接の UVB 照射よりも、UVB を照射した角化細胞のメディウムのほうが、線維芽細胞からの MMP-1 の放出を引き起こすことが報告されている[41, 42]。

UV 照射がヒトの肌で最初に引き起こす反応は ROS の産生である。ROS は酸化ストレスを引き起こし、グルタチオン (glutathione : GSH) などの非酵素抗酸化物質の量を下げ、続いて複雑なシグナル伝達を活性化し、MMP を誘導する[34, 43]。また ROS は内因性の老化にも関係している。老化によるミトコンドリア機能の低下により酸化エネルギー産生系から過剰な ROS が産生される[44]。皮膚老化の間、ROS は増加し、抗酸化の防御能は低下する[45]。

抗酸化物質はそのような酸化ストレスを減らし、皮膚老化を抑えうる物質だと期待されてきた。近年、特に、フェノール酸、フラボノイド、高分子ポリフェノールなど自然界で生じたポリフェノールがその抗酸化力から有益な皮膚保護物質として注目を集めており[46]、epigallocatechin gallate (EGCG) 、resveratrol、quercetin などのポリフェノールが UV 誘導の皮膚老化に対して保護作用を示すという研究が次々に報告されている[47-49]。

トケイソウ (パッションフラワー) は薬用ハーブとして知られるパッションフラワー属の総称であり、アメリカの熱帯が原産である。既存の報告では、葉・つる・花などが多くのポリフェノールを含んでおり、抗不安・抗炎症・咳止めなどの効果が知られている

[50-54]。その実はパッションフルーツとよばれ、種子とともに食べられている。これまで、パッションフルーツ種子が高い抗酸化活性をもつ piceatannol や scirpusin B を高含有していることを見出した。

そこで私は、パッションフルーツ種子エキス(PFSE) 、 piceatannol および scirpusin B のヒト角化細胞 GSH 量への影響を検討した。さらに、これらのエキスならびに化合物で前処理した場合に UVB 照射誘導の ROS 産生量に与える影響を検討した。また間接的に線維芽細胞の MMP-1 誘導に与える影響を検討するために、 piceatannol を処理した場合の UVB 照射角化細胞培養液が線維芽細胞での MMP-1 誘導に与える影響を検討した。

## 第二節

### 実験方法

#### 2-2-1 材料

正常ヒト角化細胞 Humedia KG2 よび正常ヒト線維芽細胞 Humedia KB2 は Kurabo (Osaka, Japan) から購入した。2',7'-Dichlorodihydrofluorescein diacetate (H<sub>2</sub>DCFDA) は Calbiochem (San Diego, CA, USA) から購入した。Glutathione reductase、Triton X-100、trypsin は Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) から購入した。5,5'-Dithio-bis(2-nitrobenzoic acid) (DTNB) は Wako (Osaka, Japan) から購入した。Nicotinamide-adenine dinucleotide phosphate (NADPH) は Oriental Yeast Industries (Tokyo, Japan) から購入した。Bicinchoninic acid (BCA) protein assay reagent は Pierce (Rockford, IL, USA) から購入した。Fluorescein isothiocyanate (FITC) -labelled type I collagen は Collagen Research Center (Tokyo, Japan) から購入した。Collagenase type I は Worthington Biochemical (Lakewood, NJ, USA) から購入した。その他の試薬はすべて分析試薬レベルのものを用いた。

#### 2-2-2 UVB 照射

照射のために 300 nm 以下の短波長カットフィルター (Asahi Spectra LU0300, Tokyo, Japan) を装備した Philips TL20W/12RS UV-B MEDICAL instrument (Philips, Eindhoven, Netherlands) を用いた。UVB 照射は 40 mJ/cm<sup>2</sup> で 5 分間行い、UVB 非照射細胞についてはアルミ箔にてカバーし、UVB を遮蔽した。

### 2-2-3 サンプル調製 (PFSE, piceatannol, scirpusin B)

凍結乾燥、粉碎したパッションフルーツ種子を 30% 1,3-butylene glycol (BG) で抽出し、減圧濃縮後に凍結乾燥した。前述の方法で high-performance liquid chromatography (HPLC) による分析を行い[28]、本粉末が piceatannol (37.06 µg/mg) および scirpusin B (14.98 µg/mg) を含んでいることを確認した。また 99.0%純度の piceatannol と 91.8%純度の scirpusin B は前述の方法[27, 28]で得た。簡単には、octadecylsilyl (ODS) カラムを用いた逆相 HPLC (280 nm の UV 検出) で PFSE を分画し、減圧濃縮後に凍結乾燥した。Piceatannol は Tokyo Chemical Industry (Tokyo, Japan) から購入し、GSH 量と細胞内 ROS 測定の実験には購入した piceatannol を用いた。抽出物と試薬に HPLC チャートの差はなく、GSH 誘導活性にも差はなかった (データ未発表)。

### 2-2-4 GSH 量

正常ヒト角化細胞 Humedia KG2 medium を用いて、96-well dish に  $2.0 \times 10^4$  cells/well の細胞密度で播種した。播種 24 時間後、細胞を所定の濃度の試料を含んだ新鮮な Humedia KG2 medium で 24 時間培養し、glutathione reductase recycling method を用いて総 GSH レベルを決定した[55]。超音波処理で破碎した細胞液 50  $\mu$ L を 125  $\mu$ L リン酸バッファー (0.1 M, pH 7.5) と混合し、25  $\mu$ L NADPH と 25  $\mu$ L glutathione reductase (3.2 units/mL) を加えて 37°C で 10 分間反応させた。その後、25  $\mu$ L の 10 mM DTNB を加え、添加直後および 10 分間インキュベート後の反応液の吸光度の差を GSH 産生量の指標とした。細胞破碎液中の総 GSH 量は、酸化型グルタチオンを用いて作成した検量線より算出した。細胞破碎液のタンパク質含有量は bicinchoninic acid (BCA) protein assay reagent を用いて決定した。

#### 2-2-5 細胞内 ROS 測定

正常ヒト表皮細胞 HuMedia KG2 を用いて、96-well dish に  $2.0 \times 10^4$  cells/well の細胞密度にて細胞を播種した。播種 24 時間後に所定濃度の試料を含んだ新鮮な Humedia KG2 medium で 24 時間培養した後、dichlorodihydrofluorescein assay を用いて細胞内 ROS 量を測定した[56]。活性酸素検出プローブである  $H_2DCFDA$  を 20  $\mu$ M 含有する Hanks' buffered solution ( $Ca^{2+}$  および  $Mg^{2+}$  未含有)

で HuMedia KG2 細胞を 30 分間培養し、H<sub>2</sub>DCFDA を細胞内に取り込ませた。Hanks' buffered solution で細胞を洗浄後、UVB 照射し、100 μL Triton X-100 (0.5%) にて溶解し、溶解液の蛍光強度 (Excitation/Emission = 485/530 nm) を蛍光プレートリーダー (Molecular Devices Co., CA, USA) を用いて測定した。タンパク質含有量は BCA protein assay reagent を用いて決定した。細胞内の ROS 量は、単位タンパク質あたりの蛍光強度を試料未処理コントロールの蛍光強度を 100 とした場合の相対値として表した。また、Carl Zeiss Filter Set 17 (Excitation = BP 485/20 nm, Emission = BP 515-565 nm) を用いた顕微鏡 (Carl Zeiss Microscopy, Tokyo, Japan) で画像を得た。

#### 2-2-6 MMP-1 assay

正常ヒト角化細胞 HuMedia KG2 を用いて、6-well dish に  $5.0 \times 10^5$  cells/well の細胞密度にて播種した。播種 24 時間後に所定濃度の試料を含有した Humedia KB2 に交換し 24 時間培養した。その後、Hanks' balanced salt solution (Ca<sup>2+</sup> および Mg<sup>2+</sup> 未含有) に交換し、UVB 照射した。さらに試料を含まない新鮮な Humedia KB2 に交換し、24 時間培養した。この培養液を“keratinocyte-conditioned medium”と名づけた。

正常ヒト線維芽細胞を 5% 仔牛血清含有 Dulbecco's modified Eagle's medium (Sigma-D6046, low glucose) を用いて 96-well dish に  $2.0 \times 10^4$  cells/well の細胞密度にて播種した。播種 24 時間後に細胞を keratinocyte-conditioned medium で 48 時間処理し、培養液に分泌された MMP-1 を定量した。培養上清 (80  $\mu$ L) を 10  $\mu$ L trypsin (0.05 mg/mL) と 37°C で 15 分反応後、10  $\mu$ L soybean trypsin inhibitor (0.25 mg/mL) を加えて反応を終了させた。MMP-1 の活性は fluorescein isothiocyanate (FITC) -labelled type I collagen を基質として 37°C で 2 時間酵素反応した。その後、分解していない collagen を 150  $\mu$ L 70% エタノール添加の沈殿処理にて除去し、分解されたコラーゲンの蛍光強度を Excitation/Emission = 495/520 nm で測定した。酵素活性は 1 分間に 1  $\mu$ g のコラーゲンを分解する活性を 1 unit として定義した。培養していないメディウムと collagenase type I をネガティブおよびポジティブコントロールとし、タンパク質含有量は BCA protein assay reagent を用いて決定した。

### 2-2-7 統計解析

データは  $n = 3 - 5$  で測定し、mean  $\pm$  standard deviation (SD) で表記した。統計解析は Student's *t*-test を用いて評価し、 $P < 0.05$  を統計的に有意とした。

### 第三節

#### 結果

##### 2-3-1 パッションフルーツ種子エキスの角化細胞のグルタチオン量への影響

パッションフルーツ種子エキス (PFSE) のヒト角化細胞 Humedia KG2 への効果を調べるために、Humedia KG2 細胞を PFSE、piceatannol、または scirpusin B で処理した後に、細胞内の酸化還元状態に重要な役割をはたす抗酸化物質 GSH 量を測定した。PFSE や piceatannol の 24 時間の処理は濃度依存的に GSH を誘導した。PFSE は GSH 量を 6.25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  で 17% ( $P < 0.0005$ )、12.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  で 33% ( $P < 0.0005$ )、25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  で 77% ( $P < 0.0005$ ) 増加させた。Piceatannol は GSH 量を 0.25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  で 13% ( $P < 0.05$ )、1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  で 22% ( $P < 0.05$ )、2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  で 63% ( $P < 0.0005$ ) 増加させた。Scirpusin B は 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  で 12% ( $P < 0.05$ ) と若干増加させた (Figure 2-1)。細胞内のタンパク量は PFSE や scirpusin B で変化しなかったが、2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  piceatannol では低下した (データ未発表)。

##### 2-3-2 パッションフルーツ種子エキスの角化細胞の UVB 誘導 ROS 産生への影響

PFSE の UVB 誘導 ROS 産生への効果を調べるために、UVB (40  $\text{mJ}/\text{cm}^2$ ) 照射の 24 時間前に Humedia KG2 細胞を PFSE、piceatannol、または scirpusin B で処理した。UVB 照射によって細胞内の ROS 量が約 2 倍に増加したが、PFSE や



piceatannol の前処理により照射・非照射いずれの Humedia KG2 細胞でも濃度依存的な ROS 量低下が見られた。照射 Humedia KG2 細胞では未処理の細胞と比べ、PFSE 処理 6.25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  で 12% ( $P < 0.05$ )、12.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  で 31% ( $P < 0.0005$ )、25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  で 44% ( $P < 0.0005$ ) 減少した。Piceatannol 処理 0.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  で 13% ( $P < 0.05$ )、1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  で 21% ( $P < 0.005$ )、2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  で 58% ( $P < 0.0005$ ) 減少した。Scirpusin B 処理 0.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  で 4% ( $P < 0.05$ )、2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  で 12% ( $P < 0.05$ ) 減少した。興味深いことに、低濃度 (3.125  $\mu\text{g}/\text{mL}$  や 0.125  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) の PFSE や piceatannol は若干 (4-5%,  $P < 0.05$ ) 非照射 Humedia KG2 細胞で ROS を増加させた (Figure 2-2)。

### 2-3-3 Piceatannol の UVB 照射 keratinocyte-conditioned medium 処理線維芽細胞の MMP-1 活性化に与える間接的影響

Piceatannol の間接的な線維芽細胞 Humedia KB2 への影響を検討するために、UVB (10  $\text{mJ}/\text{cm}^2$ ) 照射後の角化細胞メディウム (keratinocyte-conditioned medium) を Humedia KB2 細胞へ添加し MMP-1 活性を測定した。Humedia KB2 細胞の MMP-1 活性は keratinocyte-conditioned medium 添加により 2 倍増加した。角化細胞 Humedia KG2 を UVB 照射前に piceatannol で処理した keratinocyte-conditioned medium は、piceatannol 未処理に比べて、Humedia

KB2 細胞の MMP-1 の活性を 0.125  $\mu\text{g}/\text{mL}$  で 37% ( $P < 0.05$ )、0.25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  で 34% ( $P < 0.005$ )、0.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  で 25% ( $P < 0.005$ )、1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  で 30% ( $P < 0.05$ ) 抑えた。加えて、UVB 非照射で piceatannol を処理した keratinocyte-conditioned medium も Humedia KB2 細胞の MMP-1 活性を、0.125  $\mu\text{g}/\text{mL}$  で 37% ( $P < 0.05$ )、0.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  で 42% ( $P < 0.05$ ) 抑制した (Figure 2-3)。

## 第四節

### 考察

UV照射による肌でのROS産生は光老化の主な初期原因であるため[57]、抗酸化防御システムによってROSが消去されなければ酸化ストレスとなり、細胞死、炎症、コラーゲン分解、血管機能の低下などの経路によって肌の老化を加速する。一方で、植物成分からの抗酸化物質は光老化を予防することが期待できるため、化粧品成分として植物成分を用いることができれば表皮から浸透して角化細胞へ直接的に作用を示すと考えられる。そこで本節では、PFSE や piceatannol の UVB 照射角化細胞 Humedia KG2 への光老化に対する有効性を調べた。

まず、PFSE や piceatannol が Humedia KG2 細胞内の GSH 量を濃度依存的に増加させることを示した。PFSE は BG 抽出液の状態では 127.8 µg/mg の piceatannol を含んでいるが、細胞実験のために BG を除去する行程で piceatannol は 2/3 に減少している。そのため、PFSE の効果濃度は piceatannol 単独の効果濃度と同程度であったことから、piceatannol が PFSE の Humedia KG2 細胞への影響の主活性成分だと考えられ、piceatannol が Humedia KG2 細胞の酸化状態を変えていると推定された。Scirpusin B は piceatannol の二量体で piceatannol よりも高い抗酸化活性を持っていることが報告されているが[28]、GSH の誘導は piceatannol より弱かった。これは化合物の細胞透過性や細胞内分布が関与している

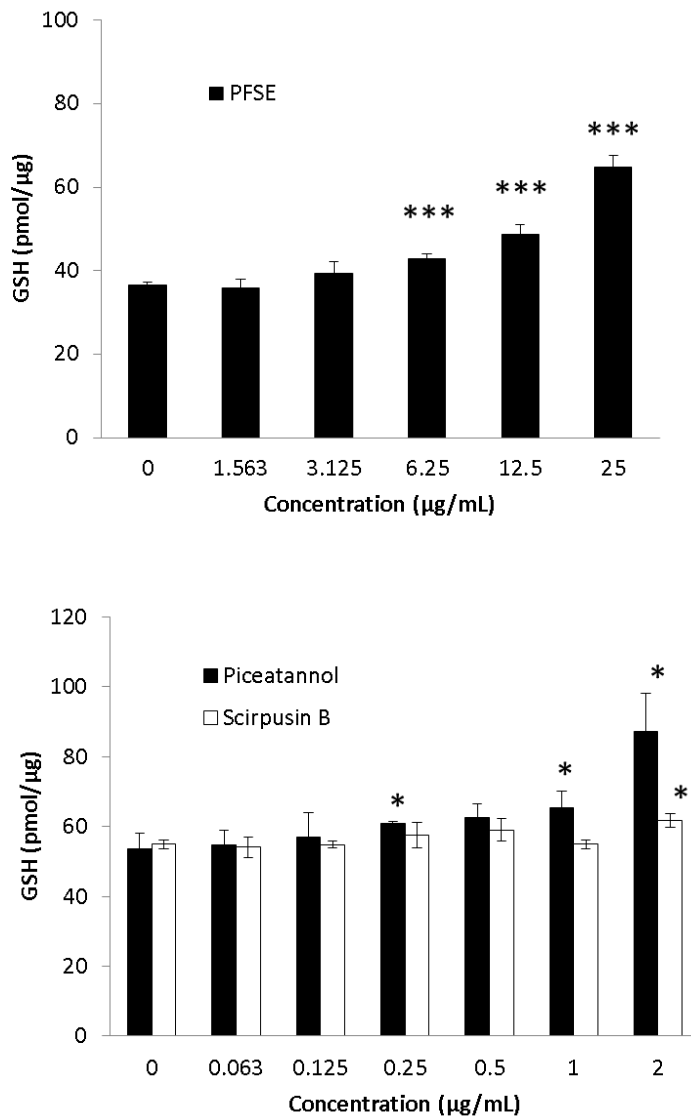
と考えられた。細胞内 GSH は様々な化学物質や UV 照射で引き起こされる酸化ストレスから肌を保護するのに重要な役割を果たしている。UV 照射は GSH レベルを低下させることが知られており[58]、UVB 誘導の GSH 低下はいくつかの皮膚病の発症に関与していると考えられる。今回の結果から、piceatannol や PFSE は角化細胞で GSH 量を増加させ、肌で UV 保護の役割を果たすと考えられた。一方、piceatannol は B16 melanoma 細胞で GSH 量を増加させることが報告されているが[59]、melanocytes では UVB 照射が GSH 量に影響がないことが知られている[60]。そのため、melanocyte で piceatannol が UVB 照射に影響を与えるかは不明である。

次に ROS 産生への影響を検討した結果、PFSE や piceatannol は UVB 照射・未照射どちらでも ROS 産生を抑制した。Piceatannol により誘導された GSH が ROS 産生量減少に寄与した可能性も考えられる。また、piceatannol は抗酸化物質であることから、取り込まれた piceatannol が直接 ROS を消去した可能性も考えられる。低濃度の PFSE や piceatannol は UV 未照射の角化細胞で ROS 産生を増加したが、これは抗酸化物質が特定の状況では pro-oxidants として働く一般的な現象と考えられた。

最後に線維芽細胞への間接的な影響を検討した。光老化の特徴のひとつは MMP-1 による結合組織の破壊であり[39]、UVB は ROS 誘導の MMP-1 産生の引き金になることが報告されている[57, 61]。UVB 照射角化細胞 Humedia KG2 への

piceatannol の前処理が線維芽細胞 Humedia KB2 での MMP-1 産生に与える影響を評価することにした。まず、UVB 照射 Humedia KG2 細胞のメディウムが Humedia KB2 細胞で MMP-1 活性を誘導することを確認した。次に、Humedia KG2 細胞を UVB 照射前に piceatannol で処理すると、Humedia KB2 細胞の MMP-1 誘導が抑えられることがわかった。この結果は piceatannol による ROS 抑制と関係していると考えられる。ただ、piceatannol による MMP-1 の抑制は濃度依存的ではない一方、piceatannol による ROS 抑制は濃度依存的であった。このことから、角化細胞での ROS がある一定以上抑制されれば、線維芽細胞での MMP-1 抑制には十分だと思われた。興味深いことに、非照射の piceatannol 処理メディウムも線維芽細胞 Humedia KB2 で MMP-1 の誘導を抑制した。Piceatannol は角化細胞 Humedia KG2 で UVB 非照射の場合にも内因性の ROS を抑制したので、UVB 非照射の場合にも角化細胞による MMP-1 誘導があり、それを抑制したと考えられた。ただ、非照射の場合には pro-oxidant として働く低濃度側でも MMP-1 活性抑制が見られた。Piceatannol は添加後に洗浄して除去していること、さらにメディウム中での安定性が低いことから、線維芽細胞に添加した角化細胞メディウム中には残存していないと考えられ、piceatannol が ROS 以外の他の分子経路に影響した結果、メディウム中の物質が変化した可能性が考えられる。

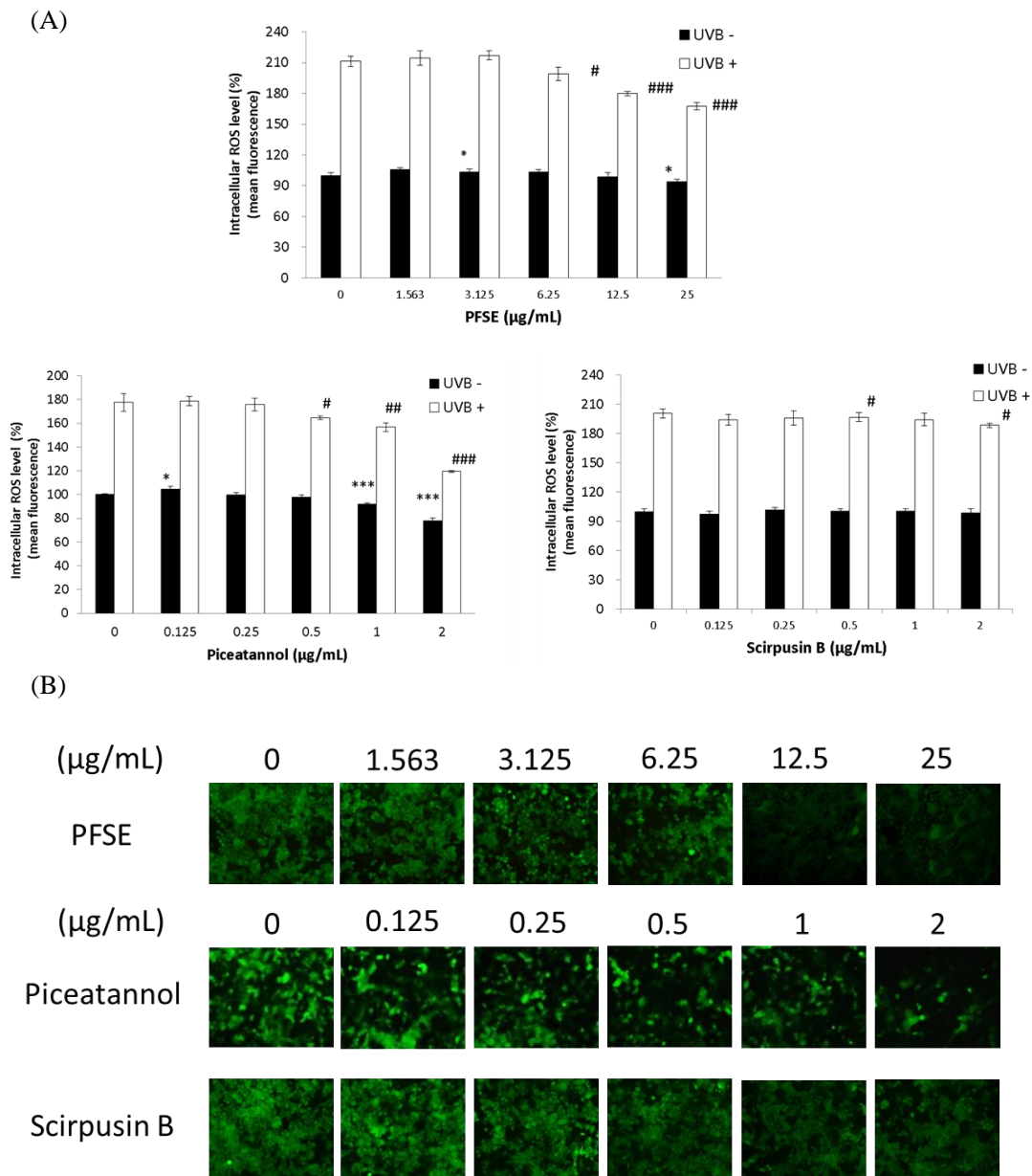
本研究の結果を Figure 2-4 にまとめた。Piceatannol は抗酸化物質 GSH の量を増やすことで、UV 照射による ROS の増加を抑制し、間接的に線維芽細胞での MMP-1 の誘導を抑制すると考えられた。他にも piceatannol は様々な生理活性を示す[62]。例えば、piceatannol は nuclear factor-kappa B (NF- $\kappa$ B) や STAT3 および STAT5 を含むいくつかの転写因子を抑制し[63, 64]、p56lck protein-tyrosine kinase や spleen tyrosine kinase (Syk) を阻害する[25, 65]。線維芽細胞では、piceatannol は MMP-1 を誘導する JAK1/STAT-1 経路を阻害し[66]、コラーゲン産生を促進し、メラニン合成を阻害するなど、肌によい効果が報告されている[27, 59]。これらの結果をあわせると、piceatannol や piceatannol を高濃度で含有した PFSE は新しい光老化予防化粧品素材になる可能性がある。



**Figure 2-1. Intracellular GSH levels of PFSE, piceatannol, and scirpusin B in keratinocytes**

Keratinocytes were treated with various concentration of passion fruit seeds extract (PFSE), piceatannol or scirpusin B for 24 hr. The GSH levels were measured using the DTNB, as described in page 14.

Values are mean  $\pm$  SD ( $n = 3-5$ ). Statistical analysis was performed using Student's  $t$ -test.  $*P < 0.05$ ,  $***P < 0.0005$ , significantly different from non-treatment.

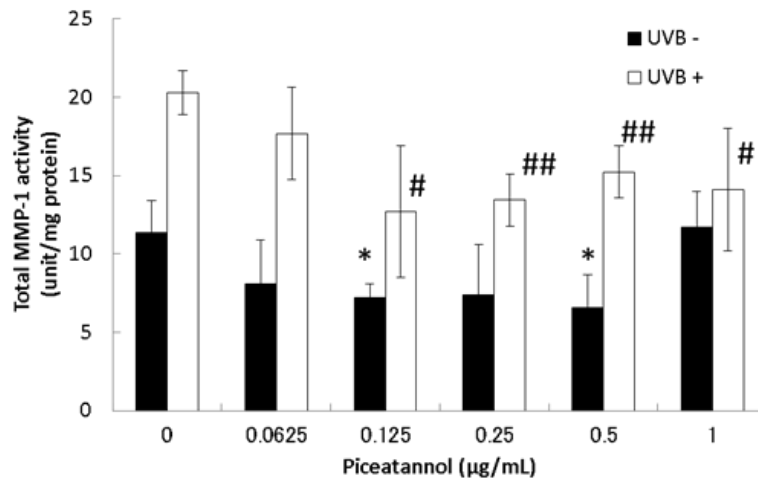


**Figure 2-2. The effect of PFSE, piceatannol, and scirpusin B on ROS generation in keratinocytes**

Keratinocytes were treated with various concentration of passion fruit seeds extract (PFSE), piceatannol or scirpusinB for 24 hr prior to UVB irradiation (40 mJ/cm<sup>2</sup>). (A) At 5 min after the UVB irradiation, the intracellular ROS generation was measured using the H<sub>2</sub>DCFDA method, as described in page 15. (B) Representative fluorescence microscopy images showing the decrease of fluorescence intensity of H<sub>2</sub>DCF produced by ROS.

Values are mean ± SD (n = 4). Statistical analysis was performed using Student's *t*-test. \*, # *P* < 0.05, ## *P* < 0.005, \*\*\*, ### *P* < 0.0005, significantly different from each non-treatment.



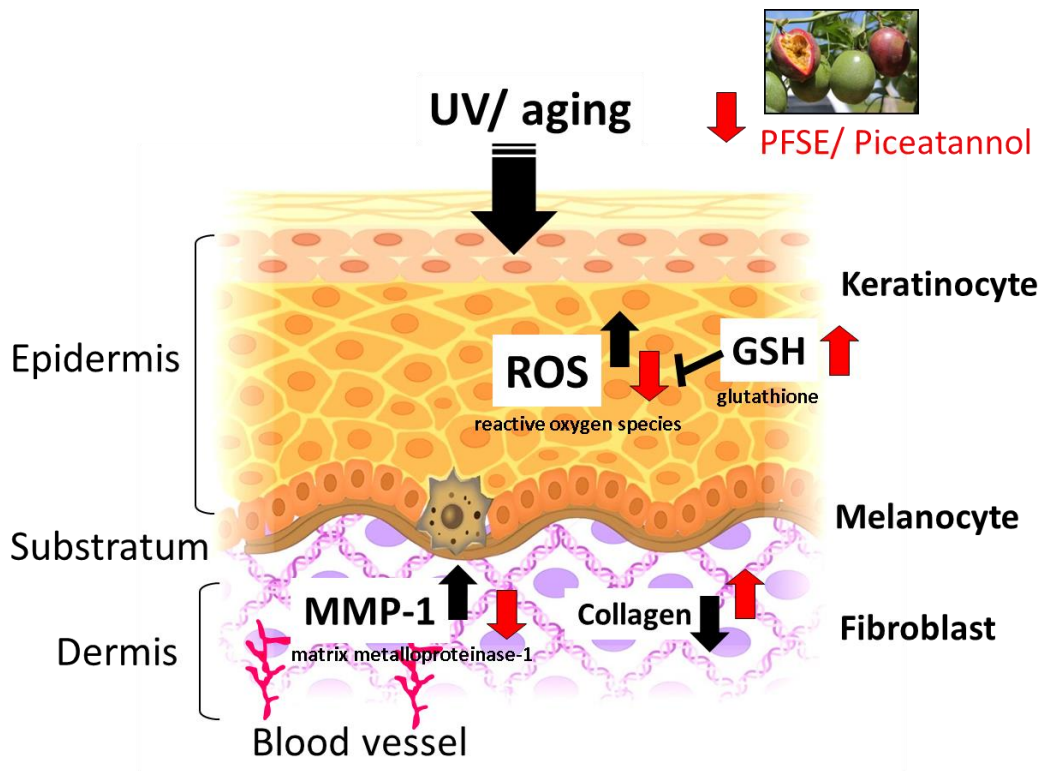


**Figure 2-3. The indirect effect of piceatannol on the MMP-1 activity in fibroblasts**

Keratinocytes were pretreated with various concentration of piceatannol for 24 hr prior to UVB irradiation (40 mJ/cm<sup>2</sup>). At 5 min after UVB-irradiation, the keratinocytes were cultured in new medium (keratinocyte conditioned medium) for 24 hr. Fibroblasts were treated with each keratinocyte conditioned medium for 48 hr and MMP-1 secreted into the cultured media was determined as described in page 16.

Values are mean  $\pm$  SD ( $n = 4$ ). Statistical comparison analysis was performed using Student's *t*-test.

\*, #  $P < 0.05$ , ##  $P < 0.005$ , significantly different from each non-treatment.



**Figure 2-4. Summary of chapter 2**

Black arrows indicate the effect of UV and aging damage and red arrows indicate the effect of treatment with passion fruit seed extract (PFSE) and piceatannol.

### 第三章 Piceatannol およびパッションフルーツ種子エキスによる血糖値への効果

#### 第一節

#### 背景および目的

加齢や生活習慣による代謝性疾患は世界で増加している。代謝性疾患は肥満患者の増加により起こる代謝の疾患で、II 型糖尿病や心血管疾患のリスクの増加と関係している。特に糖尿病は生活の質を低下させ、医療費を増大させる。多くの糖尿病治療薬が臨床的に利用可能な一方で、長い期間血糖値を一定に維持するのは難しい。それゆえ、II 型糖尿病を予防または改善する機能性食品の開発は重要な課題である。

Resveratrol は様々な機能性の中でも代謝性疾患を予防する化合物として多く報告されている[11-15]が、報告の中では reseedarol は高脂肪食誘導の動物の肥満を抑制することが多数報告されている[11, 67, 68]。またヒトにおいても糖代謝に好ましい影響を与えることが報告されている[69, 70]。しかし、肥満抑制については、いずれのヒト試験でも reseedarol 処理による体重減少の報告はない[22]。

Piceatannol は reseedarol と似た機能性を示すにもかかわらず、植物中の含量が resveratrol よりもかなり少ないため[71]、研究はあまり進んでいなかった。これま

でに piceatannol がパッションフルーツ種子に豊富に含まれること[27]、血管拡張、eNOS 発現増強、コラーゲン産生促進、メラニン抑制、UVB 保護作用といった様々な機能性を示すことを見出してきた[27-29, 72]。いくつかの場合には piceatannol は resveratrol よりも高い活性を示した[27, 29]。しかし piceatannol の代謝性疾患への影響は報告がなかった。

そこで私は、まず高脂肪食 (HFD) 負荷のマウスを用いて piceatannol が与える影響を検討した。次に、パッションフルーツ種子エキス (PFSE) の機能性食品としての可能性を調べるために、PFSE や piceatannol を遺伝的糖尿病モデルマウスである *db/db* マウスに投与し、血糖降下作用を検討した。

## 第二節

### 実験方法

#### 3-2-1 材料

Piceatannol は Tokyo Chemical Industry (Tokyo, Japan) から購入した。Piceatannol は 0.5% carboxymethyl cellulose (CMC) に投与の直前 3 時間以内に溶解した。

#### 3-2-2 PFSE の調製

凍結乾燥、粉碎した PFSE を 80°C で 10 倍量の 80% (v/v) エタノールで 120 分還流し、減圧濃縮後に凍結乾燥した。前述した方法で HPLC による分析を行い[23]、本乾燥粉末には piceatannol (94.9 µg/mg) および scirpusin B (54 µg/mg) が含まれていることを確認した。PFSE は 0.5% CMC に piceatannol 2 mg/mL、piceatannol 5 mg/mL となるように投与の直前 3 時間以内に溶解した。

#### 3-2-3 HFD マウスへの piceatannol の影響

10 週齢のオスマウス C57BL/6Jcl は Clea japan Inc. (Japan) から購入し、通常  
の条件 (温度 23 ± 2°C、湿度 50 ± 10%、12 時間日長、午前 7 時点灯) で飼育し

た。14 日間の実験室状況へ順化の後、平均体重をもとに 12 週齢の C57BL/6Jcl マウス ( $n = 48$ ) を 6 つのグループに分けた。1 つのグループは通常の餌 (normal diet [ND; AIN-93G; Oriental Yeast Co.])、残りの 5 つのグループは高脂肪食の餌 (HFD [HDF32; Clea Japan Inc.]) を与え、水とそれぞれの餌は自由摂取とした。餌の組成は Table 3-1 に示した。ND と HFD のコントロール群 ( $n = 7-8$ ) は 5 mL/kg control solution [0.5% CMC (Nacalai Tesque)] を 1 日に 1 回、5 週間投与した。HFD の piceatannol 投与群 ( $n = 8$ ) はそれぞれの濃度 (1, 3, 10, および 30 mg/kg body weight) の piceatannol 溶液 (8 mL/kg in 0.5% CMC) を 1 日に 1 回、5 週間投与した。実験期間中は C57BL/6Jcl マウスの体重と摂餌量を測定し、屠殺の前日は絶食とした。エーテル麻酔下で血液を集め、30 分室温で凝固させて、遠心して血清を得た。血清グルコースは hexokinase による UV 法で測定した[73]。血清インスリンおよびレプチンの量は、enzyme-linked immunoassay (ELISA) kit (Morinaga Institute of Biological Science, Japan) を用いて測定した。

#### 3-2-4 糖尿病マウスへの PFSE や piceatannol の血糖への影響

II 型糖尿病モデルマウス (*db/db* マウス) はレプチン受容体の遺伝的な変異により肥満、高血糖、高インスリン、または正常インスリンを発症する。9 週齢のオスマウス BKS.Cg-Dock7m+/+Leprdb/J は Charles River Japan から入手した。マウスは通

常の条件（温度  $23.2 \pm 1.3^{\circ}\text{C}$ 、湿度  $44 \pm 5\%$ 、12 時間日長、午前 7 時点灯）で飼育した。水と餌（D08111509; Research Diet, Inc, New Brunswick, NJ, USA）は自由摂取とした。14 日間の実験室状況へ順化の後、11 週齢の BKS.Cg-Dock7m+/+Leprdb/J マウス（ $n = 32$ ）を平均体重と平均血糖値がそろっように 4 つのグループに分けた。コントロールグループ（ $n = 8$ ）は 5 mL/kg control solution [0.5% CMC (Wako)] を投与し、piceatannol グループ（ $n = 8$ ）は 0.5% CMC の 50 mg/kg piceatannol を投与した。また、PFSE グループ（ $n = 8$ ）は 0.5% CMC の 5 mL/kg PFSE (10 または 50 mg/kg piceatannol) を投与した。経口投与後、マウスを絶食させ、血液を 0, 1, 2, 3, および 4 時間毎に採取した。血液は self-monitoring blood glucose instrument (FreeStyle Freedom, Nipro, Japan) を使って解析した。

### 3-2-5 統計解析

データは mean  $\pm$  standard error of the mean (SEM) で表記した。統計解析は SPSS software (version 22, IBM) を用いて行った。ND グループとコントロール HFD グループは Student's *t*-test を用いて評価し、 $P < 0.05$  を統計的に有意とした。異なる濃度の piceatannol を投与した HFD グループは一元配置分散分析を実施し、有意差があった場合にはその後の多重比較として Dunnett's test を実施した。db/db

マウスグループと piceatannol 投与マウスグループの統計解析は、one-sided Student's *t*-test を用いて行った。異なる濃度の PFSE を投与した *db/db* マウスグループの比較は一元配置分散分析を実施し、有意差があった場合にはその後の多重比較として Dunnett's one-side test を実施した。 $P < 0.05$  や  $< 0.01$  を統計的に有意とした。

### 3-2-6 動物実験倫理

HFD マウスへの piceatannol の影響検討の実験は、「実験動物の飼養および保管並びに苦痛の軽減に関する基準」を踏まえて、日本学術会議によって策定された「動物実験の適正な実施に向けたガイドライン」(2006 年) を遵守して適正に実施した。実験プロトコルは森永製菓株式会社の動物実験委員会で承認された (165-1-001-01) 。

糖尿病マウスへの PFSE や piceatannol の血糖への影響検討の実験は、実験施設の「動物愛護規定」、「動物実験委員会規定」および「動物実験承認規定」を遵守して適正に実施し、この委員会で承認を得た。



### 第三節

#### 結果

##### 3-3-1 Piceatannol の HFD マウスへの影響

通常食 (ND) または高脂肪食 (HFD) を C57BL/6Jcl マウスに 5 週間与えた結果、摂餌量は HFD 群で  $2.82 \pm 0.07$  g/day と ND 群の  $3.07 \pm 0.06$  g/day より有意に少ないものの、エネルギー換算では逆転し、体重 (HFD:  $31.05 \pm 0.74$  kg vs. ND:  $27.33 \pm 0.47$  kg)、皮下脂肪 (HFD:  $535.1 \pm 64.1$  mg vs. ND:  $227.1 \pm 21.3$  mg)、内臓脂肪量 (HFD:  $1774.0 \pm 208.7$  mg vs. ND:  $649.7 \pm 62.7$  mg)、インスリン値 (HFD:  $0.56 \pm 0.10$  ng/mL vs. ND:  $0.47 \pm 0.06$  ng/mL)、レプチン値 (HFD:  $10.26 \pm 1.54$  ng/mL vs. ND:  $2.46 \pm 0.28$  ng/mL)、血糖値 (HFD:  $322.0 \pm 6.6$  mg/dL vs. ND:  $232.9 \pm 6.8$  mg/dL) とインスリン値以外は HFD-fed マウスで ND-fed マウスより有意に高かった (Figure 3-1)。HFD 負荷期間に 1 日 1 回 piceatannol (1, 3, 10, および 30 mg/kg body weight) の投与を行ったが、体重 (Figure 3-1(A))、摂餌量 (Figure 3-1(B))、皮下脂肪 (Figure 3-1(C))、内臓脂肪量 (Figure 3-1(D))、インスリン値 (Figure 3-1(E)) およびレプチン値 (Figure 3-1(F)) は変化がなかった。内臓脂肪に関しては、精巣周囲、腎周囲、および腸間膜の合計として測定したが、piceatannol 投与はいずれの部位の脂肪にも影響を与えな

かった（データ未発表）。10 mg/kg piceatannol 投与群のみでコントロールの HFD 群（ $322.0 \pm 6.6$  mg/dL）と比べて血糖値の有意な低下が見られた（ $283.0 \pm 5.1$  mg/dL,  $P=0.020$ ）（Figure 3-1(G））。

### 3-3-2 PFSE の *db/db* マウスへの影響

Piceatannol で血糖低下作用が見られたので、さらに PFSE の機能性食品の可能性を検討するために、PFSE または piceatannol を 11 週齢の *db/db* マウスに投与した。Figure 3-2 に示すように、0.5% CMC のコントロール群では、1 時間後には血糖値が上昇したが 2 時間後には戻り、時間とともに低下した。Piceatannol（50 mg/kg body weight）の単回投与はコントロール群に比べて 1 時間後の血糖値を低下させた。PFSE（10 または 50 mg/kg piceatannol）の単回経口投与は、1 時間後の血糖値をコントロール群に比べて低下させ、その効果は 3 時間後まで続いた。

## 第四節

### 考察

今回、私は resveratrol の類似構造をもった piceatannol が高脂肪食誘導の代謝性疾患モデルマウスに与える影響を検討した。その結果、マウスの体重に影響はないものの、血糖値を有意に低下させることがわかった。また、piceatannol と同様に piceatannol を高含有する PFSE が *db/db* マウスで血糖を低下させることを見出した。これらの結果から、piceatannol を豊富に含む PFSE が糖尿病予防または治療食品となりうる可能性を示した。

Resveratrol は高脂肪食負荷マウスで AMPK の活性化、*SIRT* 活性化、脂質形成阻害、腸内細菌改善などにより体重を抑制することが報告 [11, 67-69, 74] されている一方で、piceatannol に関しては、報告は少ないが 3T3-L1 細胞でインスリンシグナルに影響を与えて脂肪蓄積を抑制することが知られている [75]。したがって、piceatannol もまた HFD 誘導の体重を抑制することが期待できるが、*in vivo* での HFD マウスへの影響は報告されていなかった。本研究で 1 日 1 回の piceatannol の経口投与は HFD マウス体重や内臓脂肪量に影響を与えないことがわかった。ただ投与方法による差や種差も考えられ、さらなる検討が必要である。また、10 mg/kg の piceatannol の投与は HFD マウスの血糖値を降下させたが、30 mg/kg の

piceatannol の投与では傾向はあるものの有意な影響は見られなかった。Reseveratrol についても濃度によって効果が異なるとの報告がある[68, 76]。たとえば、Choらは低濃度（0.005%）の resveratrol 投与は体重増加を改善するが高濃度（0.02%）では効果がないことを示している[68]。それゆえ、piceatannolも至適な濃度がある可能性が考えられるが、これにもさらなる検討が必要である。

また今回の研究では *db/db* マウスにおいて投与後血糖値が一過的に上がっているが、これは投与ストレスによるものだと考えられた。同条件の実験を別施設で行った結果を Figure 3-3 として参照のために示す。この実験では初期の血糖値が異なるためか、投与ストレスによる血糖値上昇は見られなかったが、同様にエキスによる血糖降下作用が認められた。Piceatannolも PFSEも異なる施設で結果が得られていることから血糖値低下作用はあると考えられるが[77]、同週齢の *db/db* マウスでも初期の血糖値やその変動には違いが見られた。血糖値は測定機器・飼育環境・動物の亜系・ロットなどによって変わるので、そういった点が違いの原因になったと考えられた。

糖尿病で血糖値が高くなる原因はいくつか考えられる。今回、piceatannol や PFSEの血糖低下作用を示したが、血糖値低下作用の詳細なメカニズムを決定することはできなかった (Figure 3-4)。しかし、絶食時に piceatannol が血糖値低下効果を示したことから、その効果は糖吸収阻害ではないと考えられる。Piceatannol は AMPK 活性化を介して筋細胞での糖取り込みを促進することが報告されているが

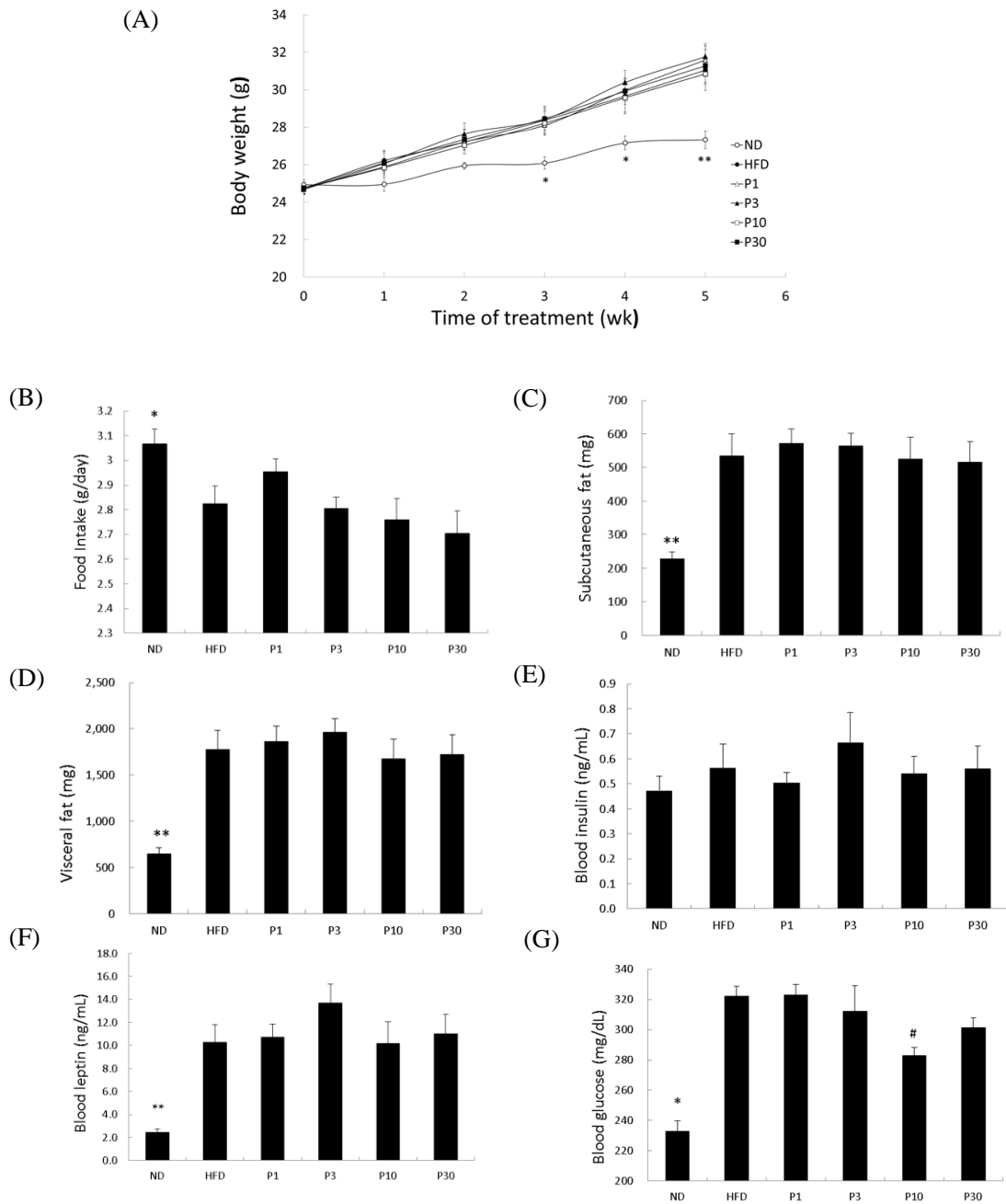
[77]、今回の結果はこのメカニズムと矛盾しない。ただ、さらなる piceatannol の血糖値低下メカニズムの検討も必要である。

パッションフルーツは生やジュースで、世界中で消費されている。種子は果肉と一緒に生の状態でしばしば食べられており食経験がある。PFSE の主なポリフェノールは piceatannol であり、ブドウなど他の植物よりかなり含量が高い。ポリフェノール豊富な食品の摂取は II 型糖尿病のさまざまな病態の治療法になりうるという報告がある [78]。ポリフェノールの糖尿病への効果は構造によって異なるが、スチルベン構造の resveratrol や piceatannol は有益な抗糖尿病効果が期待されるポリフェノールと思われる。以前に piceatannol の吸収と代謝をラットで調べた結果、piceatannol 投与後にメチル化代謝物である isorhapontigenin が血漿中に未変化体として検出された [31]。しかしながら、Isorhapontigenin は抗炎症効果の報告はあるが糖尿病への影響は全くわかっていない。一方で、PFSE の二番目に多いポリフェノールは piceatannol の二量体である scirpusin B である。Scirpusin B は  $\alpha$ -amylase を阻害してグリコーゲン経口投与時の血糖値上昇を抑えることが報告されている [79]。消化酵素の阻害は食品による血糖値低下の主なメカニズムである。したがって、scirpusin B や isorhapontigenin も PFSE の血糖値低下作用に貢献すると期待される。

以上のことから、piceatannolを豊富に含むPFSEは、新しい魅力的な抗糖尿病の機能性食品になりうると考えられる。さらなるpiceatannolやPFSEの可能性を明らかにするためには今後ヒト試験が望まれる。

**Table 3-1. Composition of diets**

(g/ 100g)	ND	HFD
Nitrogen free extract	56.5	29.4
Fat	7.7	32.0
Protein	17.6	25.5
Ash	4.4	4.0
Fiber	4.7	2.9
Moisture	9.3	6.2
Total Cal (kcal)	365.3	507.6

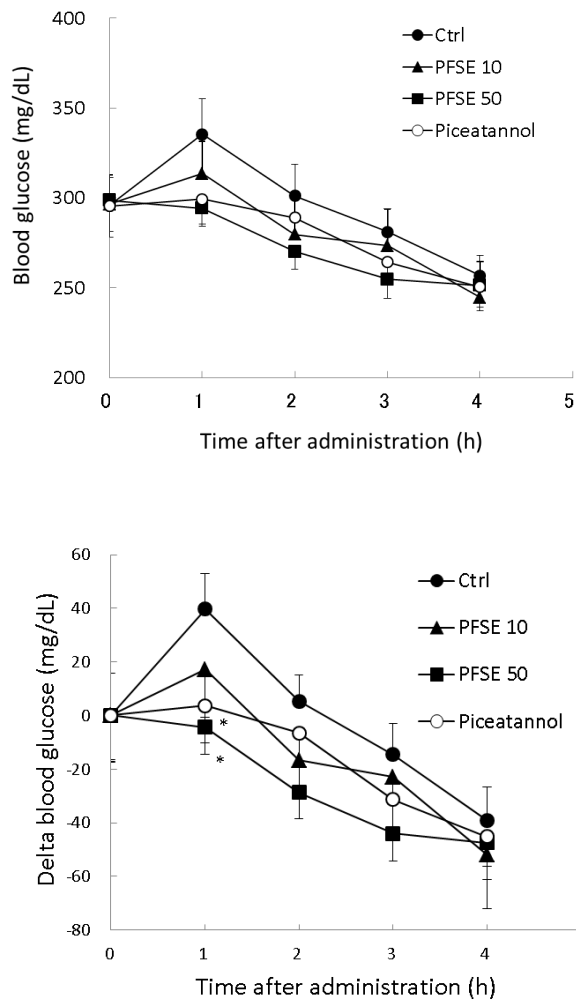


**Figure 3-1. Effect of piceatannol treatment on body weight (A), food intake (B), subcutaneous fat (C), visceral fat (D), blood insulin (E), blood leptin (F), and blood glucose (G) levels.**

C57BL/6Jcl mice were fed the normal diet (ND) or the high-fat diet (HFD) for 5 weeks. Various doses of piceatannol were administered daily to HFD-fed mice.

Values are mean  $\pm$  SEM ( $n = 7-8$ ). P1, P3, P10, and P30: HFD with 1, 3, 10, and 30 mg/kg piceatannol administration, respectively. \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , significant difference for the ND vs. the HFD groups. #  $P < 0.05$ , significant difference vs. the control HFD group.

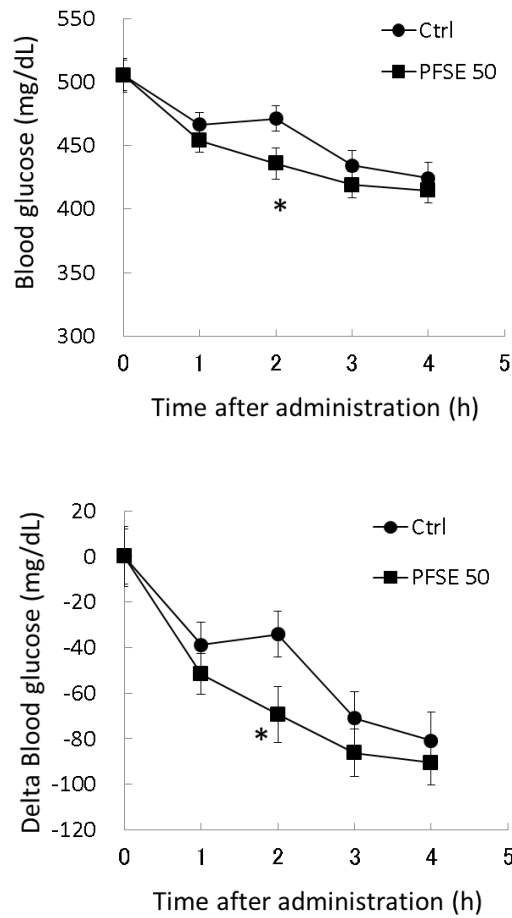




**Figure 3-2. Effect of passion fruit seed extract (PFSE) and piceatannol on blood glucose levels of *db/db* mice.**

Mice were administered 0.5% carboxymethyl cellulose (CMC) (control; ctrl), 50 mg/kg piceatannol, PFSE containing 10 mg/kg piceatannol (PFSE 10), or PFSE containing 50 mg/kg piceatannol (PFSE 50); blood glucose levels were determined before and 1–4 h after administration. Mice were deprived of food (D08111509) after oral administration.

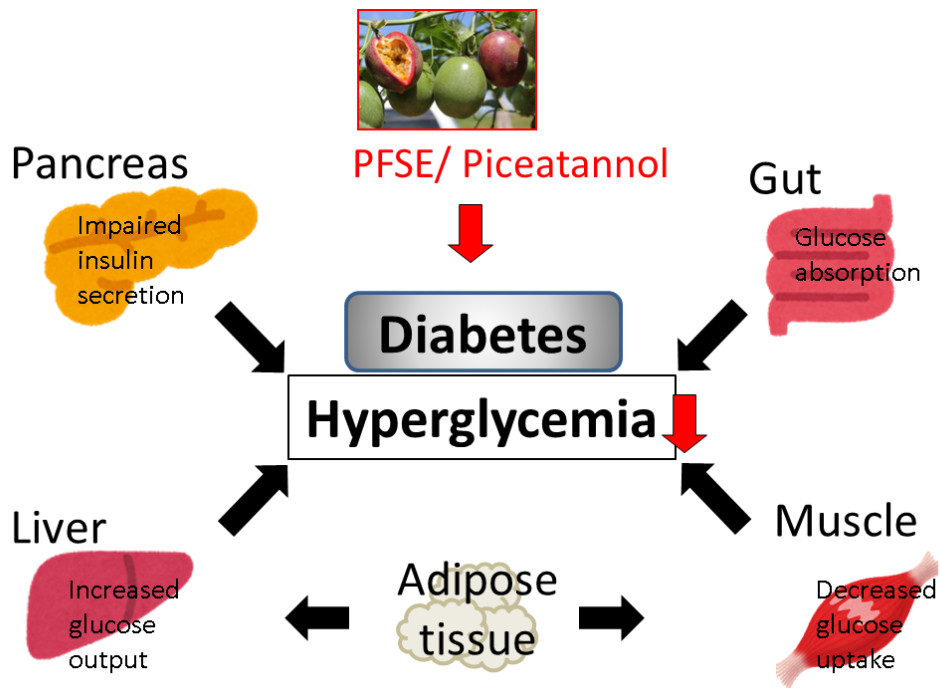
Values are mean  $\pm$  SEM ( $n = 8$ ). \*  $P < 0.05$ , significant difference vs. the control group.



**Figure 3-3. Reference data : Effect of passion fruit seed extract (PFSE) on blood glucose levels of *db/db* mice.**

Mice were administered 0.5% carboxymethyl cellulose (CMC) (control; ctrl) or PFSE containing 50 mg/kg piceatannol (PFSE 50); blood glucose levels were determined before and 1–4 h after administration. Mice were deprived of food (AIN93G) after oral administration.

Values are mean  $\pm$  SEM ( $n = 10$ ). \*  $P < 0.05$ , significant difference vs. the control group.



**Figure 3-4. Summary of chapter 3**

Black arrows indicate the diabetes condition and red arrows indicate the effect of treatment with passion fruit seed extract (PFSE) and piceatannol.

## 第四章 Piceatannol 高含有パッションフルーツ種子エキスによる

### ラットの血管や肝臓への効果

#### 第一節

#### 背景および目的

過度な動物性脂肪の摂取は、肥満、高脂血症、炎症、動脈硬化をもたらし、心血管疾患の発症リスクを高める[80]。一方、食べ物や飲み物から様々なポリフェノールをとる健康的な食生活は心血管疾患のリスクを減らすことがわかっている[6]。特に、赤ワインポリフェノールである *resveratrol* はフレンチパラドックスから研究が進み、動脈硬化、高血圧、虚血再灌流障害、心不全など心血管疾患に影響することが報告されている[81]。またそのメカニズムとしては、*resveratrol* の抗炎症[82]、eNOS 発現上昇[83]、血管弛緩増強[84]および血小板凝集抑制[85]といった生物活性が考えられる。また近年では、ヒトでも血管機能の改善といった有効性も明らかになってきている[22]。

*Piceatannol* や *scirpusin B* は eNOS 発現上昇、内皮依存血管弛緩増強、冠動脈血流量の増加など *resveratrol* と似た様々な活性を示すことが知られている[28-30, 86, 87]。興味深いことに、*piceatannol* は未変化体で *resveratrol* よりも高く吸収され[31]、eNOS 発現、抗炎症については *piceatannol* の方が *resveratrol* より高い活性

を示す[29, 82]。それゆえ、piceatannol を豊富に含むパッションフルーツ種子エキス (PFSE) は、resveratrol を豊富に含む赤ワインよりも強い心血管保護作用が期待できることから、心血管疾患に対する機能性食品となりうる可能性がある。一方で、PFSE の *in vivo* での心血管保護作用の検討は進んでいなかった。それゆえ、piceatannol を豊富に含む PFSE を調製し、ラットを用いて長期間投与することで PFSE の心血管保護作用を調べた。

ラットの心血管疾患モデルの選択は、ヒトの心血管疾患と異なり、発症年齢が若いこと、ヒトの発症に比べて短期間で薬や手術で誘導されること、ラットはヒトよりも高い血中脂肪レベルでも動脈硬化に耐性をもつこと、などから難しいと言われている[88]。また、ヒトの心血管疾患は代謝性疾患の合併症とも関係している。代謝性疾患の簡便なモデルとしては高脂肪食誘導のラットモデルがあるので[89]、高脂肪食による肝臓や血清脂質の増加が報告されていた Fischer 344 ラットを初期の心血管疾患のモデルラットとして用いることとした[90]。

本章では、piceatannol や scirpusin B を豊富に含む PFSE の心血管疾患や肝臓へ与える影響を、F344 ラットへの慢性的な高脂肪食誘導心血管疾患モデルを用いて検討した。肝臓は組織学的観察や血漿生化学検査により、また心血管は心エコーや血管の反応性によりその機能の変化を調べた。

## 第二節

### 実験方法

#### 4-2-1 PFSE の調製と分析

3-2-2 に示した。

#### 4-2-2 ラット、実験食、PFSE 添加

F344 オスラット (7 週齢,  $n = 24$ ) は Charles River Japan Inc. (Kanagawa, Japan) から購入した。12 時間の明暗サイクルで、自由に飲水できる環境の温度と湿度が制御された部屋で F344 ラットを飼育し、実験の開始 1 週間前から順化させた。

F344 ラットを無作為にコントロール群、HF 群および HF+PFSE 群の 3 群に分け、それぞれコントロール群は CRF-1 (Oriental Yeast, Tokyo, Japan,  $n = 4$ )、HF 群は western diet (Oriental Yeast, Tokyo, Japan,  $n = 10$ ) および HF+PFSE 群は western diet+PFSE (5 g/kg food, Oriental Yeast, Tokyo, Japan,  $n = 10$ ) を 16-17 週間摂取させた (Table 4-1)。詳細な HF および HF+PFSE の組成や比率を Table 4-2 に示した。F344 ラットの体重は1週間に 1 度ならびに摂餌量は 1 週間に 2 度測定した。

#### 4-2-3 血液と組織回収

試験の終わり（16-17 週）にすべての F344 ラットを 18 時間絶食させて腹腔内へヘパリン（1,000 units/kg, Sawai Pharmaceutical Co., Osaka, Japan）を投与した。エーテル麻酔下でラットを開腹し、血液は腹部大動脈から血漿を得る場合には EDTA 添加で、また血清を得る場合には EDTA 非添加で回収し、1,160 g で 15 分間遠心した後 -80°C で保存した。心臓、肝臓および脂肪（腸間膜、腹膜、精巣周囲）を単離して重量を測定した。

#### 4-2-4 血清分析

血清 triglyceride (TG)、cholesterol (CHO)、alanine aminotransferase (ALT) および aspartate aminotransferase (AST) 量は Fuji Dry Chem 7000 machine (Fuji Film, Tokyo, Japan) を用いて、それぞれ TG-PIII, TCHO-PIII, GPT (glutamate pyruvate transaminase) /ALT-PIII, GOT (Glutamate-Oxaloacetate Transaminase) /AST-PIII の Fuji Dry Chem Slides (Fuji Film) を用いて測定した。

#### 4-2-5 血小板凝集能分析

F344 ラットから採取した全血サンプル (1 mL) は 3.8%のクエン酸ナトリウム (クエン酸ナトリウム:血液 = 0.5:9.5) を添加して、室温で 1 時間静置した。Optical aggregometer (WBA-4S, MC-Medical. Co., Tokyo, Japan) を *in vitro*の血小板凝集の評価に用いた。血小板のアゴニスト (adenosine diphosphate (ADP) , 16, 32, 64, および 128  $\mu$ M) の添加に従って凝集した血小板および凝集圧の変化を micromesh filter (300 openings of  $30 \times 30 \mu\text{m}^2$  in a 1-mm-diameter area) を用いて検出した。それぞれのサンプルの最終的な血小板凝集圧は圧検出器の比率 (%) として決定した。

#### 4-2-6 組織学

F344 ラットから肝臓を取り出した後、modified Krebs-Henseleit buffer gassed with 95% O<sub>2</sub> and 5% CO<sub>2</sub> (37°C and pH 7.4) で洗浄した。バッファーは 118 mM 塩化ナトリウム、4.7 mM 塩化カリウム、24.9 mM 重炭酸ナトリウム、1.18 mM 硫酸マグネシウム、1.18 mM リン酸二水素カリウム、11.1 mM ブドウ糖、1.8 mM 塩化カルシウムおよび 0.057 mM アスコルビン酸で調製した。肝臓の組織サンプルは10% formaldehyde で4°C、一晩かけて、パラフィンに埋込み固定化し、3- $\mu$ m の標本に切断した。DMI3000B microscope (Leica Microsystems Ltd., Tokyo, Japan) を用



いて、hematoxylin and eosin (H&E) ならびに Masson trichrome 染色切片の脂肪や線維化の変化を観察した。

#### 4-2-7 ドブタミン負荷心エコー

心エコー試験は EUB-6500 echocardiographic imaging system (Hitachi Medical Corp., Chiba, Japan) を用いて、10 MHz で試験終了の1週間前に行った。F344 ラットを 1.5-1.8% isoflurane で麻酔させた後、0.1 mg/kg dobutamine の腹腔内投与後、仰臥位に寝かせて手足に電極を装着した。M-mode echocardiography を行い、心拍数、左心室駆出率、左心室内径短縮率、収縮期末および拡張期末の左心室内径、左心室後壁厚、左心室容積、拍出量、心拍出量を測定した。

#### 4-2-8 血管反応性測定

F344 ラットの胸の大動脈を単離し、余分な脂肪や結合組織を除き、血管を 2 mm のリングに切断した。いくつかの実験では、内皮細胞は鉗子で内膜表面を丁寧にこすることで除去した。内皮細胞の除去は、 $10^{-6}$  M phenylephrine で収縮させた血管が acetylcholine ( $10^{-6}$  M) で弛緩しないことにより確かめた。血管リングはオルガンバスに設置し、modified Krebs-Henseleit solution gassed with 95% O<sub>2</sub> and 5% CO<sub>2</sub>

(37°C and pH 7.4) で満たした。溶液は 118 mM 塩化ナトリウム、4.7 mM 塩化カリウム、24.9 mM 重炭酸ナトリウム、1.18 mM 硫酸マグネシウム、1.18 mM リン酸二水素カリウム、11.1 mM ブドウ糖、1.8 mM 塩化カルシウムで調整した。血管の張力は等尺性張力測定装置 (7T-15-240, Orientec, Tokyo, Japan) で収縮力の変化により測定し、止まっている時の張力を 1.0 g と設定した。血管は事前に phenylephrine ( $10^{-6}$  M) で収縮させ、acetylcholine ( $10^{-9}$ – $10^{-5}$  M) の累積弛緩曲線を測定した。Acetylcholine 弛緩曲線は phenylephrine によって誘導された収縮に対する割合で表記した。

#### 4-2-9 統計解析

データは mean  $\pm$  SEM で表記した。2 グループ間の差は Student's *t*-test を用いて解析し、3 グループ間の差は SPSS software (version 22) を用いて一元配置分散分析を実施し、有意差があった場合にはその後の多重比較として Tukey's test を行うか、二元配置分散分析を実施した。二元配置分散分析で因子間に有意差があった場合は、グループ間の対比をさらに行った。 $P < 0.05$  を統計的に有意とした。

#### 4-2-10 動物実験倫理

すべての実験動物は米国国立衛生研究所の“the Guide for Care and Use of Laboratory Animals” (NIH Publication NO. 85-23, revised 1996) と山形大学の“山形大学動物実験規定 (平成 19 年 10 月 1 日規定第 72 号)”を遵守して行った。実験プロトコルは山形大学医学部の動物実験委員会で承認された (Identification number: 132)。

### 第三節

#### 結果

##### 4-3-1 摂餌量、体重、組織重量

F344 ラットの摂餌量、体重および組織重量を Table 4-3 にまとめた。摂餌量はコントロール群と比べ、HF 群および HF+PFSE 群では減少した ( $P < 0.01$ ,  $P < 0.01$ ) が、HF 群と HF+PFSE 群では同程度であった。一方で、エネルギーの摂取量は 3 つの群で同程度であった。最終的な HF+PFSE 群の体重はコントロール群より統計的に高かった ( $P < 0.05$ ) が、HF 群とコントロール群ならびに HF 群と HF+PFSE 群は統計的に有意な差は見られなかった。HF 群の肝重量は統計的にコントロール群より高かったが、HF+PFSE 群は HF 群より有意に低かった。内臓脂肪は、腸間膜、腹膜、精巣周囲の合計で計算したが、HF 群の脂肪はコントロール群より統計的に高くなかった。一方、HF+PFSE 群の脂肪は HF 群やコントロール群より高かった ( $P < 0.01$ ,  $P < 0.01$ )。

##### 4-3-2 代謝パラメーター、血小板凝集能

F344 ラットの血清 TG と CHO レベルは 16 週間の摂餌後に測定した (Table 4-3)。HF 群の血清 TG と CHO レベルはコントロール群より高かった ( $P < 0.01$ ,  $P <$

0.01)。加えて、HF+PFSE 群の血清 TG と CHO レベルは HF 群より低かった ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )。

ADP 誘導の血小板凝集能も測定した結果 (Figure 4-1)、HF 群の血小板凝集能はコントロール群より高い誘導を示した。加えて、HF+PFSE 群の血小板凝集能は HF 群に比べて抑制された (64 および 128  $\mu\text{M}$  ADP において、順にコントロール群: 16.83 および 20.73%; HF 群: 37.71 および 52.75%; HF+PFSE 群: 21.65 および 37.24%)。

また、HF 群の ALT や AST はコントロール群のそれらより高く ( $P < 0.01$ ,  $P < 0.01$ )、HF+PFSE 群の ALT や AST は HF 群のそれらより低かった ( $P < 0.01$ ,  $P < 0.05$ ) (Table 4-3)。

### 4-3-3 肝臓の構造

F344 ラットの肝臓の重量や血清脂質プロファイルは各グループで異なっていたので、この効果をさらに調べるために肝臓組織切片を H&E 染色した。HF 群の肝臓組織はコントロール群に比べ、脂肪滴や風船様変性、高い炎症細胞の浸潤が見られた。これらは HF 群と HF+PFSE 群で差が見られなかった (Figure 4-2 a-g)。肝臓切片については Masson trichrome 染色も行ったが、HF 群はコントロール群に比べて異

常な線維化と胆管様構造が見られたが、HF+PFSE 群では HF 群に比べて異常な線維化と胆管様構造が抑えられた (Figure 4-2 h-j)。

#### 4-3-4 心臓の機能

F344 ラットの心臓の機能を調べるために、ドブタミンストレス前後の左心室の心エコー評価を行った (Table 4-4)。この実験ではコントロール群の 5 匹のうち 3 匹の動物は他の実験で用いたコントロール群とは異なり、実験期間が別の同条件の動物であったので、コントロール群の結果は参考値とした。ドブタミン負荷前に HF+PFSE 群では HF 群と比べて収縮期末の左心室内径が有意に減少していた (HF 群および HF+PFSE 群で、順に 4.37 および 3.73 mm,  $P < 0.05$ )。ドブタミンストレス後、HF 群では HF+PFSE 群に比べて左心室駆出率 (EF) が低かった (HF 群および HF+PFSE 群で、順に 75.6, および 86.6%,  $P = 0.052$ )。さらに、左心室内径短縮率 (FS) は HF 群で HF+PFSE 群に比べて低かった (HF 群および HF+PFSE 群で、順に 43.2 および 51.4%,  $P < 0.05$ )。

#### 4-3-5 血管反応性

F344 ラットの血管の機能を調べるために大動脈の血管反応性を調べた。Acetylcholin 誘導の大動脈の血管弛緩はコントロール群に比べて HF 群で

acetylcholin 濃度  $3 \times 10^{-7}$  から  $1 \times 10^{-5}$  M で反応性が低かった。一方、反応性が低下した HF 群に比べ、HF+PFSE 群では acetylcholin 濃度  $1 \times 10^{-8}$  と  $3 \times 10^{-7}$  M で反応性が改善した (Figure 4-3)。しかしながら、全ての群で、内皮除去大動脈では血管反応は見られなかった (データ未発表)。

## 第四節

### 考察

本実験では、F344 オスラットを心血管疾患のモデル動物として用いた。高脂肪食負荷により血清脂質プロファイルの変化とともに、肝臓構造や心血管機能の変化も見られた。コントロール群と HF 群の間に体重や内臓脂肪増加の統計的な差は見られなかったが、piceatannol を豊富に含む PFSE の長期摂取は、高脂肪食が誘導した肝臓構造の異常や心血管機能の低下を改善した。これらの結果を Figure 4-4 にまとめた。

本研究で用いた PFSE には piceatannol が約 10%含まれている。フォーリン・チオカルト法によるポリフェノール含量は 60–70%であり、HPLC の分析チャートからは piceatannol 以外は重合度の高いポリフェノールだと考えられる（データ未発表）。重合度の高いポリフェノールはほとんど吸収されないことが報告されており[91]、今回の結果には主に piceatannol が寄与したと考えられる。また Hijona らは 6 週間の piceatannol の投与が Zucker obese ラットで脂質代謝を改善する傾向があり、肥満の合併症を抑えることを報告している[92]。このことは、本研究結果とも類似していることから piceatannol が主に寄与していることを支持すると考えられた。



PFSE 摂取は高脂肪食摂取ラットで血清 CHO や TG レベルを下げた。加えて、PFSE 摂取は ADP 誘導の血小板凝集を阻害した。高い血中 CHO や TG レベルは血管内皮機能障害から動脈硬化や心血管疾患を引き起こすことが知られている[93]。また、高脂血症は血管凝集を亢進し、過度な血管凝集や不適切な血管凝集は血栓の形成や虚血疾患の進展につながる。近年では、血小板凝集能はアテローム性動脈硬化症にきわめて重要な役割を果たすことが報告されている[94]。本研究結果は、PFSE 摂取が動脈硬化や心血管疾患を予防する可能性があることを示唆している。

さらに、肝臓の組織学的評価において、HF+PFSE 群で肝重量が抑えられ、胆管反応や線維化が抑えられたことを見出した。肝臓の胆管反応や線維化は非アルコール性脂肪肝炎でも引き起こされ、非アルコール性脂肪肝疾患や非アルコール性脂肪肝炎は食事誘導の代謝性疾患から引き起こされることが知られている[95]。血清 AST や ALT の増加は炎症・脂肪症・線維化をともなった肝臓障害の指標であり、本研究において、AST や ALT は HF 群で増加したが HF+PFSE 群で低下した。それゆえ、PFSE 摂取は肝臓を代謝性疾患から守ることも期待される。Piceatannol などのポリフェノールは抗炎症および抗酸化活性を持っていることが広く知られており[62, 82, 96]、したがってこれらが高脂肪食誘導のストレスから肝臓を保護するのに重要な役割を果たしていると考えられる。

PFSE 摂取は脂質プロファイルを改善するとともに、血管の acetylcholine への反応性を改善した。高脂肪食ラットでは acetylcholine 誘導の内皮依存的な弛緩が、減弱される。本研究では、高脂肪食ラットでは高濃度の acetylcholine によって誘導される内皮依存的な弛緩が減弱されたが、PFSE 摂取はこの影響を改善した。本研究で血管反応性改善のメカニズムは証明できなかったが、ニトロプロシド誘導の血管弛緩はどの群でも同程度であった（データ未発表）。ニトロプロシドは NO 放出剤で血管弛緩剤として使われる。それゆえ、これらの結果は NO が存在する場合の反応性は高脂肪食ラットでは変化しないが、NO の産生や生体利用効率については高脂肪食ラットで低下したことを示唆している。原因としては、高脂肪食で増加した酸化ストレスが挙げられ、これまでの *in vitro* データで示したように eNOS の増加や抗酸化活性により PFSE 摂取が NO 状態を改善したと考えられた[28, 29]。

また、PFSE 摂取は心臓の異常も改善した。心機能については、心エコー検査が有用であるが、心機能には予備機能が備わっているため、安静時には症状があらわれにくい。そのため本研究では、ドブタミン負荷によって心機能を評価した。その結果、PFSE 摂取で収縮末期心室内径（LVEsD）が低値であった。またドブタミン負荷状態下では PFSE 摂取で HF 群に比べて、左心室内径短縮率（FS）の改善が見られた。これらのことから、PFSE は HF 群で低下している収縮機能を改善していることが示唆された。したがって、PFSE が *ex vivo* だけでなく *in vivo* で心機能を効果的に改

善する可能性が考えられた[86]。ただし、心保護作用を示すには組織学的解析のような追加の実験が必要であると考えられる。

Piceatannol は 3T3L1 細胞で脂肪分化を抑制するという報告がある[75]。それゆえ、HF+PFSE 群の内臓脂肪を念入りに調べたが、第二章の研究結果 (Figure 2-1) と一致して減少は見られなかった[87]。Hijona らもまた、6 週間の piceatannol の投与が Zucker obese ラットで過食症も脂肪の蓄積も抑制しなかったと報告している[92]。これらの結果から、piceatannol は *in vivo* においては本研究で用いた濃度では瘦身効果を有していないと思われる。一方で、内臓脂肪が HF 群に比べ HF+PFSE 群では有意に増加していた。加えて、piceatannol は脂肪細胞でインプロテレノール誘導の脂肪分解を阻害した(データ未発表)。したがって、piceatannol は脂肪を蓄積する可能性もあり、さらなる研究で脂肪に対する作用を検討する必要がある。

近年、resveratrol の *in vivo* での報告は多数あり、血清 CHO や TG の低下が報告されているが[97, 98]、一方で、これらの低下が顕著ではない報告もある[99]。Resveratrol が血小板凝集能亢進を *in vivo* で阻害した報告[100]や、自然発症の高血圧ラットや高脂肪食負荷ラットで血管反応性を改善する報告 [101] もあるが、心機能や血圧に対して resveratrol は肯定的な結果も否定的な結果もある[101–103]。それゆえ、piceatannol と resveratrol の直接的な比較検討は興味深いと考えられる。

本研究において、piceatannol を平均すると 26 mg/kg body weight で動物に投与したことになる。近年の報告では、resveratrol の濃度がその効果を決めるのに重要であると考えられている[68]。加えて、ブドウポリフェノールや resveratrol の心保護作用は長期のヒト臨床試験で明らかになりつつある[104]。それゆえ、piceatannol や PFSE についてもさらなる濃度検討試験やヒト臨床試験での検討が必要である。

本研究では、高濃度の piceatannol を含む PFSE を高脂肪食ラットに長期間投与することで、PFSE 摂取が高脂肪食誘導の血管や肝臓の異常を改善することを見出し、piceatannol や PFSE が機能性食品素材となりうる可能性を示した。

**Table 4-1. Composition of diets**

(g/100 g)	Ctrl	HF	HF+PFSE
Nitrogen free extract	55.3	48.1	47.6
Fat	5.4	19.3	19.3
Protein	21.9	17.2	17.2
PFSE	0.0	0.0	0.5
Ash	6.3	2.5	2.5
Fiber	2.9	4.9	4.9
Moisture	8.2	8.0	8.0
Total Cal (kcal)	357.0	419.8	419.8

**Table 4-2. Detailed composition of diets**

Ingredient (g)	HF	HF+PFSE
Casein	198.2	198.2
L-Cystine	3	3
Corn starch	37.5	37.5
Alphanized corn starch	12.5	12.5
Sucrose	320	270
Soy oil	10	10
Cellulose powder	50	50
Vitamin mix <sup>a</sup>	10	10
Mineral mix <sup>b</sup>	35	35
Choline Bitartrate	2.5	2.5
t-Butylhydroquinone	0.042	0.042
Milk fat	200	200
Maltodextrin	99.8	99.8
Cholesterol	16.5	16.5
Cholic acid	5	5
Passion fruit seed extract	0	50
Total	1000	1000

*a*:Recommended for the AIN-93[105]

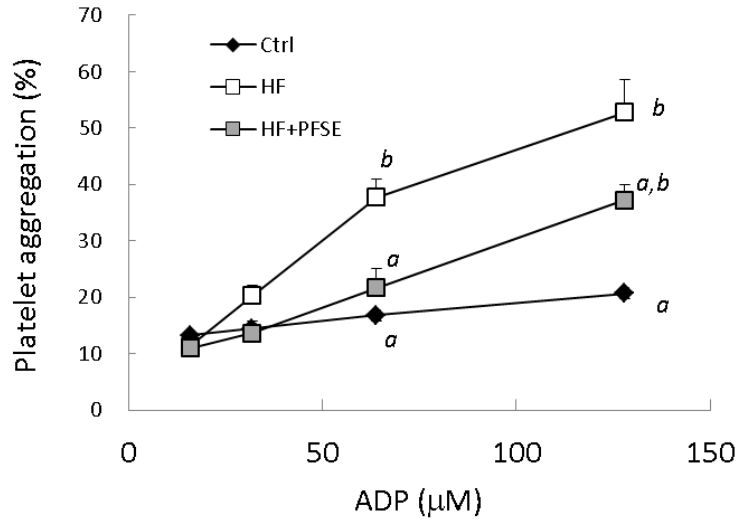
*b*: Recommended for the AIN-93G

**Table 4-3. Body weight, tissue weight, and biochemical parameters of the control (Ctrl), HF, and HF+PFSE groups**

	Ctrl (n=4)	HF (n=10)	HF+PFSE (n=10)
Initial body weight (g)	170.0±2.2	171.0±2.2	169.4±3.0
Final body weight (g)	341.5±8.6 <sup>a</sup>	350.0±3.8 <sup>a,b</sup>	362.1±4.1 <sup>b</sup>
Food intake (g/day)	18.2±0.4 <sup>a</sup>	14.4±0.1 <sup>b</sup>	14.7±0.2 <sup>b</sup>
Heart weight (g)	1.09±0.02	1.08±0.01	1.10±0.02
Heart/body weight (g/kg)	3.34±0.03 <sup>a</sup>	3.20±0.04 <sup>a,b</sup>	3.13±0.04 <sup>b</sup>
Liver weight (g)	7.96±0.37 <sup>a</sup>	18.35±0.32 <sup>b</sup>	16.17±0.39 <sup>c</sup>
Visceral fat (g)	16.79±0.68 <sup>a</sup>	18.54±0.73 <sup>a</sup>	24.57±0.87 <sup>b</sup>
Cholesterol (mg/dL)	72.8±0.9 <sup>a</sup>	478.4±5.7 <sup>b</sup>	278.5±9.0 <sup>c</sup>
Triglyceride (mg/dL)	19.5±3.0 <sup>a</sup>	126.6±3.9 <sup>b</sup>	83.2±4.0 <sup>c</sup>
ALT (U/L)	70.0±2.2 <sup>a</sup>	699.6±22.8 <sup>b</sup>	411.9±17.3 <sup>c</sup>
AST (U/L)	142.8±4.3 <sup>a</sup>	674.4±29.7 <sup>b</sup>	429.2±14.6 <sup>a</sup>

ALT, alanine aminotransferase ; AST, aspartate aminotransferase.

Values are mean ± SEM and means without a common letter differ;  $P < 0.05$  were analyzed using one way ANOVA (analysis of variance) followed by Turkey.

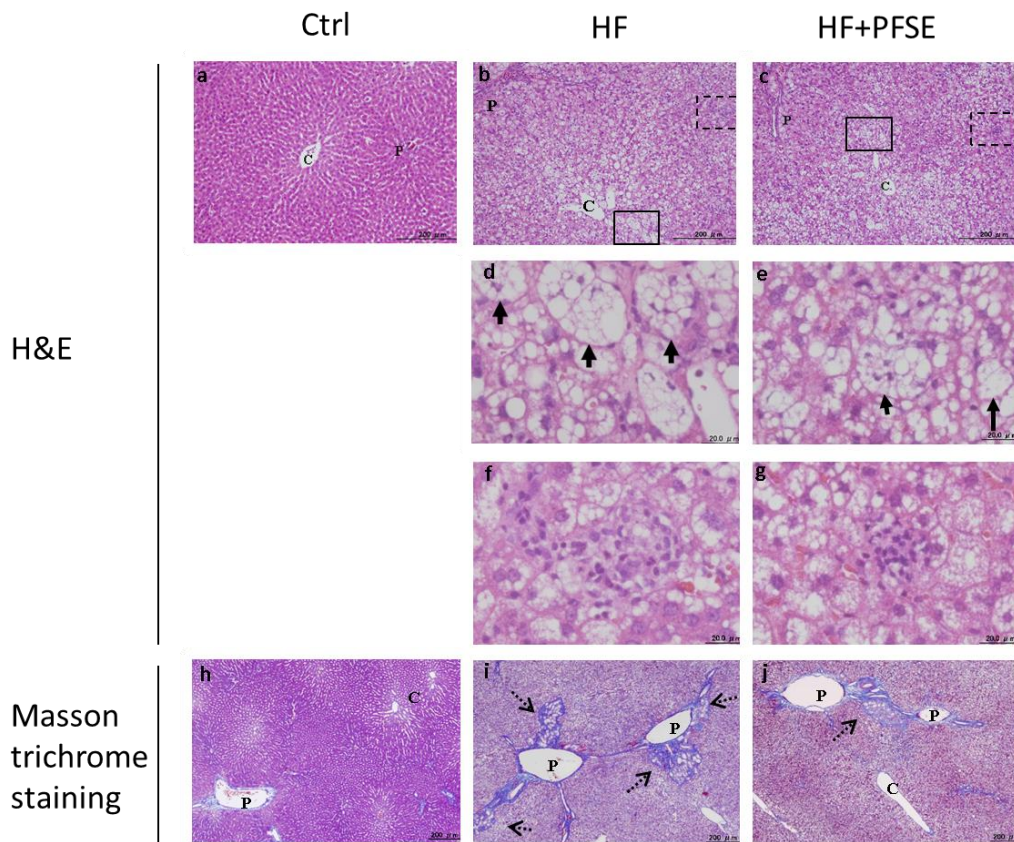


**Figure 4-1. Platelet aggregation activity in control (Ctrl), HF, and HF+PFSE groups.**

Ctrl: the control group, HF: the high group, and HF+PFSE: the high fat+PFSE group.

Values are mean  $\pm$  SEM and means without a common letter differ,  $P < 0.05$  were analyzed using two-way repeated measures ANOVA. When two-way ANOVA revealed a significant interaction between factors, contrasts were applied to compare groups.





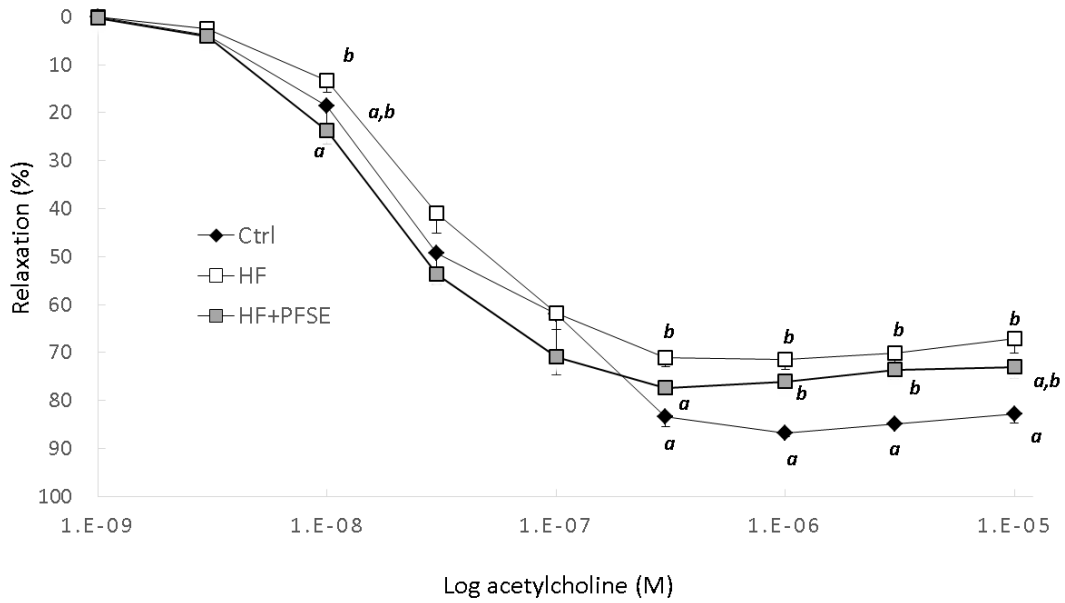
**Figure 4-2. Effect of PFSE on fat deposition, inflammation, and fibrosis in rat liver.**

H&E staining of liver showing lipid droplets ((a-c)×100), ballooning degeneration ((d, e)×630), and inflammation ((f, g)×630). Masson trichrome staining of liver sections showing fibrosis ((h-j)×50). Control(Ctrl) (a, h), HF (b, d, f, i), and HF+PFSE (c, e, g, j) groups. Portal vein, middle cardiac vein, ballooning, and ductular reaction marked P, C, ↗, and ↘, respectively.

**Table 4-4. Cardiac function of the control (Ctrl), HF, and HF+PFSE groups by dobutamine-stress echocardiography**

	Ctrl ( <i>n</i> =5)		HF ( <i>n</i> =5)		HF+PFSE ( <i>n</i> =4)	
	0 min	15 min	0 min	15 min	0 min	15 min
Heart rate (beat/min)	339±13	339±9.1	318±13	336±9	351±12	352±17
Ejection fraction (%)	80.4±3.7	87.6±3.0	72.7±1.9	79.6±1.9	76.5±1.3	86.6±2.4
Fractional shortening (%)	44.8±3.7	53.0±3.8	37.1±1.6	43.2±1.9	40.2±1.1	51.4±3.0*
IVSd (mm)	1.68±0.05	1.62±0.09	1.53±0.09	1.58±0.07	1.81±0.02*	1.40±0.20
LVEdD (mm)	6.56±0.10	6.76±0.18	6.93±0.12	6.68±0.21	6.40±0.30	6.58±0.09
LVPWd (mm)	1.85±0.10	1.66±0.15	1.53±0.06	1.74±0.14	1.79±0.19	1.55±0.12
IVSs (mm)	2.65±0.08	2.80±0.14	2.45±0.13	2.78±0.12	2.75±0.07	2.70±0.17
LVEsD (mm)	3.60±0.22	3.16±0.28	4.37±0.16	3.78±0.17	3.73±0.23*	3.20±0.22
LVPWs (mm)	2.67±0.22	3.04±0.20	2.30±0.07	2.54±0.07	2.47±0.16	2.68±0.17
LVEdV (mL)	0.65±0.03	0.71±0.05	0.76±0.04	0.63±0.11	0.62±0.07	0.65±0.02
LVEsV (mL)	0.13±0.02	0.09±0.02	0.21±0.02	0.14±0.02	0.15±0.02	0.09±0.02
Stroke volume (mL)	0.53±0.04	0.62±0.05	0.55±0.02	0.55±0.05	0.47±0.05	0.57±0.03
Cardiac output (L/min)	0.17±0.01	0.21±0.02	0.18±0.01	0.18±0.02	0.16±0.02	0.20±0.01

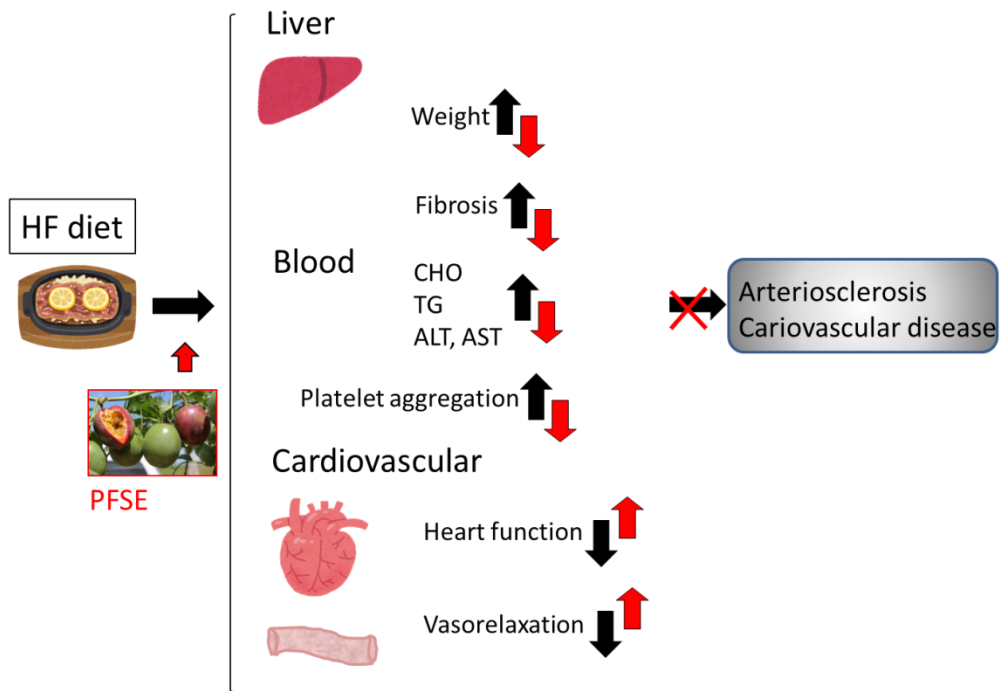
IVSd, interventricular septum thickness at endo-diastole; LVEdD, left ventricular end-diastolic dimension; LVPWd, left ventricular posterior wall thickness at endo-diastole; IVSs, interventricular septum thickness at endo-systole; LVEsD, left ventricular end-systolic dimension; LVPWs, left ventricular posterior wall thickness at endo-systole; LVEdV, left ventricular end-diastolic volume; LVEsV, left ventricular end-systolic volume. Values are mean ± SEM. \*  $P < 0.05$  were analyzed using Student's *t*-test between HF group and HF+PFSE group.



**Figure 4-3. Acetylcholine-mediated relaxation of aortic rings and *in vivo* effects of PFSE.**

Ctrl: the control group, HF: the high group, and HF+PFSE: the high fat+PFSE group.

Values are mean  $\pm$ SEM and means without a common letter differ,  $P < 0.05$  were analyzed using two-way repeated measures ANOVA. When two-way ANOVA revealed a significant interaction between factors, contrasts were applied to compare groups.



**Figure 4-4. Summary of chapter 4**

Black arrows indicate the effect of HF diet damage and red arrows indicate the effect of treatment with passion fruit seed extract (PFSE).

## 第五章 総括

先進国では高齢化社会が進み、平均寿命は右肩上がりに伸びている。一方で、医療費の増大や平均寿命と健康寿命（心身ともに自立し、健康的に生活できる期間）の乖離といった喫緊の問題を抱えている。自分で自身の健康を管理するという“セルフメディケーション”概念の推進とともに、日常的に摂取して健康維持に貢献できる食品に対する関心も高まっている。日本では特定保健制度（1991年～）や機能性表示食品制度（2015年～）など、食品が健康効果を薬事法に違反せずに表示する制度が整ってきている。

特定保健食品では、オリゴ糖、食物繊維、乳酸菌とともに、抗酸化活性をはじめとした様々な活性をもつポリフェノールが登録されている。例えば、茶ポリフェノール（虫歯菌の増殖抑制）、グァバ茶ポリフェノール（消化酵素阻害による糖質の吸収抑制）、茶カテキン・クロロゲン酸類（肝臓での脂肪燃焼促進）、ウーロン茶重合ポリフェノール・リンゴ由来プロシアニジン（膵リパーゼ阻害による脂肪吸収抑制）、モノグルコシルヘスペリジン（脂肪酸合成系の抑制と脂肪酸 $\beta$ 酸化系の亢進）、ケルセチン配糖体（リパーゼ活性化）、イソフラボン（骨からのカルシウム溶出抑制）などが挙げられる[106]。どれもヒト臨床試験を行

い、消費者庁の審査を経て、有効性・安全性ともに許可を得たものではあるが、ヒト試験の結果は医薬品ほど整合性が得られていない。

例えば茶カテキンのヒト試験では、583 mg の摂取で、脂肪減少、収縮期血圧低下、LDL-コレステロール低下が示されている[107]。カフェインとの組み合わせや他のポリフェノールとの組み合わせでの脂肪減少も報告され、脂肪に対する研究 [108-110] も多いが、Brown らは 400 mg の摂取で、拡張期血圧低下が起こるものの脂肪には影響がないこと[111]、また Dostal らは 843 mg の EGCG 摂取で脂肪には影響がないことを報告している[112]。このような矛盾は、生活習慣に起因する現象を見ているのでコントロールが難しいこと、食品ゆえに成分の同等性が異なること、あるいは効果が弱いことが原因だと考えられる。成分に関していえば、カテキンはエピカテキン、エピガロカテキン、エピカテキンガレートおよびエピガロカテキンガレート (EGCG) の 4 種類が存在し、生育場所や製造工程、加熱処理によって含量に変化がみられる。

機能性表示食品制度でも低分子化ライチポリフェノール (疲労軽減)、ターミナリアベリリカ由来ポリフェノール (中性脂肪抑制)、ショウガ由来ポリフェノール (体温維持)、松樹皮由来プロシアニジン (コレステロール低下)、ビルベリー由来アントシアニン (目のピント機能改善) などが報告されている[113]。これらの結果から、ポリフェノールは様々な機能性で有効だと考えられるが、

しっかりとした効果を検証するためには、成分の同等性からはじめ、安全性も含め多くの研究が必要である。

本研究ではスチルベン骨格のポリフェノールである piceatannol に着目した。Piceatannol は赤ワインポリフェノールの resveratrol に類似した構造をもつ化合物で、先行研究ではラットでの resveratrol 投与による piceatannol への代謝は認められなかったが[31]、一方で resveratrol の代謝により生じることが報告されている[114]。Resveratrol は日本では機能性表示が許可されていないが、99%純度の合成品も含め European Food Safety Authority (EFSA) や Food and Drug Administration (FDA) でその安全性が認められ[115]、海外では心血管疾患保護などの表記がされている。それに比べて piceatannol の研究は遅れていたが、最近急激に報告も増えてきた[62]。

肌に関しては、2015年に Shiratake らが、同じく UVB 誘導のヒト角化細胞に対し、テンニンカ中に含まれる piceatannol が保護作用を示すことを報告しており[116]、UVB 照射の保護をする点で本研究結果と一致する。また、piceatannol が DNA polymerase の酵素活性を上げ、UVB 誘導のシクロブタン型ピリミジン二量体を抑えることや炎症メディエーターのプロスタグランジン E2 の分泌を抑えることも報告されている。このことから、piceatannol はいくつもの経路で UVB に対して保護作用を示すと考えられる。また同じくトケイソ

ウ科でパッションフルーツの一種であるバナナポカ (*Passiflora tarminiana*) も有効成分ははっきりと同定されていないが、線維芽細胞において本研究結果と同様に ROS や MMP-1 を抑制し UVB 誘導の光老化を抑える報告がされている[117]。

代謝に与える影響に関しては、Hijona らが 2016 年に肥満 Zucker ラットに piceatannol を投与した結果、脂肪の蓄積や心肥大は変わらなかったが、LDL-コレステロールなどの血液パラメーターが改善したことを報告しており[92]、本研究結果 (Table 4-3) と良く一致している。一方で、Tung らは同じく 2016 年に C57BL/6 マウスの高脂肪食負荷時に 0.25%混餌で piceatannol を投与し、摂餌量に影響を与えることなく体重が抑制されたこと、AMPK が活性化され peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)  $\gamma$  が抑制されたことで、脂肪細胞での脂質の蓄積が抑えられたことを報告している[118]。高脂肪食負荷 C57BL/6 マウスに強制経口投与で piceatannol を投与した本研究とは、血糖値低下がみられた部分は一致しているが(Figure 3-1)、体重変化が見られなかった点は異なっている。Piceatannol や resveratrol といったポリフェノールは投与後の血中半減期が短いため[31]、強制経口投与と混餌では血中濃度が全く異なると考えられ、血中濃度の違いが結果の違いに寄与したものと考えられる。また報告の濃度は 370 mg/kg/day であり、本研究では経口投与 100 mg/kg/day で



摂食量が低下したことからも（データ未発表）、投与方法によって反応性は違うと考えられた。また resveratrol も体重抑制がみられる報告とみられない報告があるが[11, 119, 120]、ポリフェノール効果の系統差が報告されているので[121]、投与方法や期間だけでなく動物種の違いがポリフェノールの機能性には影響を与えている可能性も考えられた。

血糖については、piceatannol の正常ラットへの静脈投与（100 mg/kg）により初期のインスリン分泌が上昇することや耐糖能試験で血糖値が下がること[122]、また  $\alpha$ -グルコシダーゼ阻害活性を発揮してスクロースやスターチ投与前の投与（14 mg/kg）で食後の血糖値低下を抑えること[123]、さらにアロキサン誘導の糖尿病モデル Wistar ラットへの投与（30, 50 mg/kg）で血糖値を抑えて糖尿病腎症を抑制すること、なども相次いで分かってきた[124]。他にも肥満 Zucker ラットへの piceatannol の投与が早期の腎障害の改善につながることも報告されている[125]。Piceatannol は様々なメカニズムで血糖値上昇やその合併症に抑制効果を与えると考えられ、今後のヒト試験で有望な試験項目と考えられた。

心血管疾患関係では、2001年に Hung らは piceatannol がラットの虚血再灌流障害時に心保護作用を示して致死率を下げることを報告した[126]。2009年に同グループは、単離したラットの心臓を用いて piceatannol が不整脈を防ぐ効果

があることを報告した[127]。2014年には Kee らがイソプロテレノール誘導の心肥大を抑制することを報告した[128]。また、piceatannol をアルジナーゼ阻害剤として用いて加齢マウスに投与すると、血圧が低下することや acetylcholine 誘導の血管弛緩反応を増強することも報告されている[129]。今回、詳しいメカニズムは示せなかったが、piceatannol は傷害を受けた際に特に心血管保護作用を示すと考えられたため、抗酸化活性、NO 誘導活性や酵素阻害活性がメカニズムとして挙げられる。ただし、isoproterenol については検討の段階で脂肪細胞での阻害効果を見出している（データ未発表）ため、Kee らの報告でもモデル誘導に用いている isoproterenol を直接阻害している可能性も考慮する必要があると思われる。

Piceatannol と resveratrol の比較は興味深いが、その *in vivo* 実験での報告は多くない。*In vitro* の抗酸化活性は概ね piceatannol の方が高いが[62]、SIRT 活性に関してはどちらも報告がある[10, 130]。代謝に関しては、C57Bl/6 マウスを用いた  $\alpha$ -グルコシダーゼ阻害活性試験においては、resveratrol (30 mg/kg) に比べて piceatannol (14 mg/kg) の方が低濃度で血糖降下作用を示している[123]。一方、*db/db* マウスでの血糖値低下作用については、同じグループが同じ系を用いて報告をしているが、投与方法が異なるため直接の比較は難しいが、ほぼ同程度の濃度 (50 mg/kg) で類似の活性を示している[77, 131]。心血管に関しては、*ex vivo* での血管弛緩活性は resveratrol に比べて piceatannol

の方が高いことが示されているが[26]、*in vivo* で比較している報告はない。直接的な *in vivo* の比較では、piceatannol のほうが未変化体の吸収が良いこと[31]、マウスの大腸炎モデルでの NF- $\kappa$ B の抑制作用は同程度であること[132]、astrocyte の分化促進効果が piceatannol のみにあること[133]が報告されているが、その他の報告が待たれる。

現在ポリフェノールの多くは吸収されて機能を発揮するか、消化管内での消化酵素の阻害活性が期待されているが、近年腸内フローラへの影響や、吸収されないようなポリフェノールが消化管内への作用によって交感神経を刺激して効果を発揮するという報告が増えてきた[134, 135]。Piceatannol や resveratrol についても腸内細菌を変えることが報告されている[74, 92, 118]。もともとポリフェノールはその吸収性の低さから、吸収量と有効性の議論はつきなかったが、今後の研究が進むことによって新たな有効性が広がることが期待できる。また、PFSE の piceatannol 以外の成分も吸収性が低くとも有効性を発揮する可能性もあり、その機能は今後の課題と考えられる。

本研究では、今まで明らかとなっていなかった piceatannol や piceatannol を豊富に含む PFSE の肌での UVB 保護、動物での血糖値低下作用、動物での長期投与による肝臓や心血管疾患の改善効果を明らかにした。これらの研究は、その後の piceatannol における機能性研究ブームの先駆けとなり、piceatannol や

resveratrol、ひいてはポリフェノールの機能性解明の一助となったと考えられた。また化粧品への応用やヒトでの有効性検討に進めるための大事なステップとなった。また、本研究では示していないが、いくつかの検討から、PFSE における成分の同等性も確立できた。ヒトでの有効性を明らかにするにはさらに多くの試験が必要ではあるが、piceatannol や piceatannol を豊富に含む PFSE は、ヒトでの有効性が証明される可能性をもった機能性素材であることを示すことができた。

## 参考文献

- [1] Harman D. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J. Gerontol.* 1956, **11**, 298-300.
- [2] Chandrasekaran A, Idelchik MDPS, Melendez JA. Redox control of senescence and age-related disease. *Redox Biol.* 2017, **11**, 91-102.
- [3] Beckman CH. Phenolic-storing cells: keys to programmed cell death and periderm formation in wilt disease resistance and in general defence responses in plants? *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 2000, **57**, 101-110.
- [4] de Roos B, Duthie GG. Role of dietary pro-oxidants in the maintenance of health and resilience to oxidative stress. *Mol. Nutr. Food Res.* 2015, **59**, 1229-1248.
- [5] Arts ICW, Hollman PCH. Polyphenols and disease risk in epidemiologic studies. *Am. J. Clin. Nutr.* 2005, **81**, 317-325.
- [6] Li SH, Zhao P, Tian HB, Chen LH, Cui LQ. Effect of grape polyphenols on blood pressure: A meta-analysis of randomized controlled trials. *PLoS One* 2015, **10**, e0137665.

- [7] Chiva-Blanch G, Badimon L. Effects of polyphenol intake on metabolic syndrome: Current evidences from human trials. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2017, **2017**, 5812401
- [8] Renaud S, de Lorgeril M. Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease. *Lancet* 1992, **339**, 1523-1526.
- [9] Kopp P. Resveratrol, a phytoestrogen found in red wine. A possible explanation for the conundrum of the 'French paradox'? *Eur. J. Endocrinol.* 1998, **138**, 619-620.
- [10] Howitz KT, Bitterman KJ, Cohen HY, Lamming DW, Lavu S, Wood JG, Zipkin RE, Chung P, Kisielewski A, Zhang LL, Scherer B, Sinclair DA. Small molecule activators of sirtuins extend *Saccharomyces cerevisiae* lifespan. *Nature* 2003, **425**, 191-196.
- [11] Baur JA, Pearson KJ, Price NL, Jamieson HA, Lerin C, Kalra A, Prabhu VV, Allard JS, Lopez-Lluch G, Lewis K, Pistell PJ, Poosala S, Becker KG, Boss O, Gwinn D, Wang M, Ramaswamy S, Fishbein KW, Spencer RG, Lakatta EG, Le Couteur D, Shaw RJ, Navas P, Puigserver P, Ingram DK, de Cabo R, Sinclair DA. Resveratrol improves health and survival of mice on a high-calorie diet. *Nature* 2006, **444**, 337-342.

- [12] Sun C, Zhang F, Ge X, Yan T, Chen X, Shi X, Zhai Q. SIRT1 improves insulin sensitivity under insulin-resistant conditions by repressing PTP1B. *Cell. Metab.* 2007, **6**, 307-319.
- [13] Breen DM, Sanli T, Giacca A, Tsiani E. Stimulation of muscle cell glucose uptake by resveratrol through sirtuins and AMPK. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2008, **374**, 117-122.
- [14] Do GM, Jung UJ, Park HJ, Kwon EY, Jeon SM, McGregor RA, Choi MS. Resveratrol ameliorates diabetes-related metabolic changes via activation of AMP-activated protein kinase and its downstream targets in *db/db* mice. *Mol. Nutr. Food Res.* 2012, **56**, 1282-1291.
- [15] Lagouge M, Argmann C, Gerhart-Hines Z, Meziane H, Lerin C, Daussin F, Messadeq N, Milne J, Lambert P, Elliott P, Geny B, Laakso M, Puigserver P, Auwerx J. Resveratrol improves mitochondrial function and protects against metabolic disease by activating SIRT1 and PGC-1alpha. *Cell* 2006, **127**, 1109-1122.
- [16] Ndiaye M, Kumar R, Ahmad N. Resveratrol in cancer management: where are we and where we go from here? *Ann. NY Acad. Sci.* 2011, **1215**, 144-149.

- [17] Savaskan E, Olivieri G, Meier F, Seifritz E, Wirz-Justice A, Müller-Spahn F. Red wine ingredient resveratrol protects from beta-amyloid neurotoxicity. *Gerontology* 2003, **49**, 380-383.
- [18] Colman RJ, Anderson RM, Johnson SC, Kastman EK, Kosmatka KJ, Beasley TM, Allison DB, Cruzen C, Simmons HA, Kemnitz JW, Weindruch R. Caloric restriction delays disease onset and mortality in rhesus monkeys. *Science* 2009, **325**, 201-204.
- [19] Cohen HY, Miller C, Bitterman KJ, Wall NR, Hekking B, Kessler B, Howitz KT, Gorospe M, de Cabo R, Sinclair DA. Calorie restriction promotes mammalian cell survival by inducing the SIRT1 deacetylase. *Science* 2004, **305**, 390-392.
- [20] Bordone L, Cohen D, Robinson A, Motta MC, van Veen E, Czopik A, Steele AD, Crowe H, Marmor S, Luo J, Gu W, Guarente L. SIRT1 transgenic mice show phenotypes resembling calorie restriction. *Aging Cell* 2007, **6**, 759-767.
- [21] Borra M. T., Smith BC, Denu JM. Mechanism of human SIRT1 activation by resveratrol. *J. Biol. Chem.* 2005, **280**, 17187-17195.



- [22] Cottart CH, Nivet-Antoine V, Beaudeux JL. Review of recent data on the metabolism, biological effects, and toxicity of resveratrol in humans. *Mol. Nutr. Food Res.* 2014, **58**, 7-21.
- [23] Evans HM, Howe PR, Wong RH. Effects of resveratrol on cognitive performance, mood and cerebrovascular function in post-menopausal women; A 14-week randomised placebo-controlled intervention trial. *Nutrients* 2017, **9**, pii: E27.
- [24] Xiang T, Uno T, Ogino F, Ai C, Duo J, Sankawa U. Antioxidant constituents of *Caragana tibetica*. *Chem. Pharm. Bull.* 2005, **53**, 1204-1206.
- [25] Oliver JM, Burg DL, Wilson BS, McLaughlin JL, Geahlen RL. Inhibition of mast cell Fc epsilon R1-mediated signaling and effector function by the Syk-selective inhibitor, piceatannol. *J. Biol. Chem.* 1994, **269**, 29697-29703.
- [26] Yoo MY, Oh KS, Lee JW, Seo HW, Yon GH, Kwon DY, Kim YS, Ryu SY, Lee BH. Vasorelaxant effect of stilbenes from rhizome extract of rhubarb (*Rheum undulatum*) on the contractility of rat aorta. *Phytother. Res.* 2007, **21**, 186-189.

- [27] Matsui Y, Sugiyama K, Kamei M, Takahashi T, Suzuki T, Katagata Y, Ito T. Extract of passion fruit (*Passiflora edulis*) seed containing high amounts of piceatannol inhibits melanogenesis and promotes collagen synthesis. *J. Agric. Food Chem.* 2010, **58**, 11112-11118.
- [28] Sano S, Sugiyama K, Ito T, Katano Y, Ishihata A. Identification of the strong vasorelaxing substance scirpusin B, a dimer of piceatannol, from passion fruit (*Passiflora edulis*) seeds. *J. Agric. Food Chem.* 2011, **59**, 6209-6213.
- [29] Kinoshita Y, Kawakami S, Yanae K, Sano S, Uchida H, Inagaki H, Ito T. Effect of long-term piceatannol treatment on eNOS levels in cultured endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2013, **430**, 1164-1168.
- [30] Kawakami S, Kinoshita Y, Maruki-Uchida H, Yanae K, Sai M, Ito T. Piceatannol and its metabolite, isorhapontigenin, induce SIRT1 expression in THP-1 human monocytic cell line. *Nutrients* 2014, **6**, 4794-4804.
- [31] Setoguchi Y, Oritani Y, Ito R, Inagaki H, Maruki-Uchida H, Ichianagi T, Ito T. Absorption and metabolism of piceatannol in rats. *J. Agric. Food Chem.* 2014, **62**, 2541-2548.

- [32] Kligman LH, Kligman AM. The nature of photoaging: its prevention and repair. *Photodermatol.* 1986, **3**, 215-227.
- [33] Fisher GJ, Wang ZQ, Datta SC, Varani J, Kang S, Voorhees JJ. Pathophysiology of premature skin aging induced by ultraviolet light. *N. Engl. J. Med.* 1997, **337**, 1419-1428.
- [34] Fisher GJ, Talwar HS, Lin J, Voorhees JJ. Molecular mechanisms of photoaging in human skin *in vivo* and their prevention by all-trans retinoic acid. *Photochem. Photobiol.* 1999, **69**, 154-157.
- [35] Lavker RM, Zheng PS, Dong G. Aged skin: a study by light, transmission electron, and scanning electron microscopy. *J. Invest. Dermatol.* 1987, **88**, 44s-51s.
- [36] Gilchrest BA. Skin aging and photoaging: an overview. *J. Am. Acad. Dermatol.* 1989, **21**, 610-613.
- [37] Jenkins G. Molecular mechanisms of skin ageing. *Mech. Ageing Dev.* 2002, **123**, 801-810.
- [38] Fisher GJ, Kang S, Varani J, Bata-Csorgo Z, Wan Y, Datta S, Voorhees JJ. Mechanisms of photoaging and chronological skin aging. *Arch. Dermatol.* 2002, **138**, 1462-1470.

- [39] Chung JH, Seo JY, Choi HR, Lee MK, Youn CS, Rhie G, Cho KH, Kim KH, Park KC, Eun HC. Modulation of skin collagen metabolism in aged and photoaged human skin *in vivo*. *J. Invest. Dermatol.* 2001, **117**, 1218-1224.
- [40] Cutroneo KR. How is Type I procollagen synthesis regulated at the gene level during tissue fibrosis. *J. Cell. Biochem.* 2003, **90**, 1-5.
- [41] Fagot D, Asselineau D, Bernerd F. Direct role of human dermal fibroblasts and indirect participation of epidermal keratinocytes in MMP-1 production after UV-B irradiation. *Arch. Dermatol. Res.* 2002, **293**, 576-583.
- [42] Dong KK, Damaghi N, Picart SD, Markova NG, Obayashi K, Okano Y, Masaki H, Grether-Beck S, Krutmann J, Smiles KA, Yarosh DB. UV-induced DNA damage initiates release of MMP-1 in human skin. *Exp. Dermatol.* 2008, **17**, 1037-1044.
- [43] Kang S, Chung JH, Lee JH, Fisher GJ, Wan YS, Duell EA, Voorhees JJ. Topical N-acetyl cysteine and genistein prevent ultraviolet-light-induced signaling that leads to photoaging in human skin *in vivo*. *J. Invest. Dermatol.* 2003, **120**, 835-841.

- [44] Sohal RS, Weindruch R. Oxidative stress, caloric restriction, and aging. *Science* 1996, **273**, 59-63.
- [45] Ma W, Wlaschek M, Tantcheva-Poór I, Schneider LA, Naderi L, Razi-Wolf Z, Schüller J, Scharffetter-Kochanek K. Chronological ageing and photoageing of the fibroblasts and the dermal connective tissue. *Clin. Exp. Dermatol.* 2011, **26**, 592-599.
- [46] Svobodová A, Psotová J, Walterová D. Natural phenolics in the prevention of UV-induced skin damage. *Biomed. Pap. Med. Fac. Univ. Palacky Olomouc Czech Repub.* 2003, **147**, 137-145.
- [47] Bae JY, Choi JS, Choi YJ, Shin SY, Kang SW, Han SJ, Kang YH. (-)Epigallocatechin gallate hampers collagen destruction and collagenase activation in ultraviolet-B-irradiated human dermal fibroblasts: involvement of mitogen-activated protein kinase. *Food Chem. Toxicol.* 2008, **46**, 1298-1307.
- [48] Liu Y, Chan F, Sun H, Yan J, Fan D, Zhao D, An J, Zhou D. Resveratrol protects human keratinocytes HaCaT cells from UVA-induced oxidative stress damage by downregulating Keap1 expression. *Eur. J. Pharmacol.* 2011, **650**, 130-137.

- [49] Erden Inal M, Kahraman A, Köken T. Beneficial effects of quercetin on oxidative stress induced by ultraviolet A. *Clin. Exp. Dermatol.* 2011, **26**, 536-539.
- [50] Barbosa PR, Valvassori SS, Bordignon CL Jr, Kappel VD, Martins MR, Gavioli EC, Quevedo J, Reginatto FH. The aqueous extracts of *Passiflora alata* and *Passiflora edulis* reduce anxiety-related behaviors without affecting memory process in rats. *J. Med. Food* 2008, **11**, 282-288.
- [51] Coleta M, Batista MT, Campos MG, Carvalho R, Cotrim MD, Lima TC, Cunha AP. Neuropharmacological evaluation of the putative anxiolytic effects of *Passiflora edulis* Sims, its sub-fractions and flavonoid constituents. *Phytother. Res.* 2006, **20**, 1067-1073.
- [52] Montanher AB, Zucolotto SM, Schenkel EP, Fröde TS. Evidence of anti-inflammatory effects of *Passiflora edulis* in an inflammation model. *J. Ethnopharmacol.* 2007, **109**, 281-288.
- [53] Vargas AJ, Geremias DS, Provensi G, Fornari PE, Reginatto FH, Gosmann G, Schenkel EP, Fröde TS. *Passiflora alata* and *Passiflora*

*edulis* spray-dried aqueous extracts inhibit inflammation in mouse model of pleurisy. *Fitoterapia* 2007, **78**, 112-119.

[54] Dhawan K, Sharma A. Antitussive activity of the methanol extract of *Passiflora incarnata* leaves. *Fitoterapia* 2002, **73**, 397-399.

[55] Baker MA, Cerniglia GJ, Zaman A. Microtiter plate assay for the measurement of glutathione and glutathione disulfide in large numbers of biological samples. *Anal. Biochem.* 1990, **190**, 360-365.

[56] Keller A, Mohamed A, Dröse S, Brandt U, Fleming I, Brandes RP. Analysis of dichlorodihydrofluorescein and dihydrocalcein as probes for the detection of intracellular reactive oxygen species. *Free Radic. Res.* 2004, **38**, 1257-1267.

[57] Scharffetter-Kochanek K, Brenneisen P, Wenk J, Herrmann G, Ma W, Kuhr L, Meewes C, Wlaschek M. Photoaging of the skin from phenotype to mechanisms. *Exp. Gerontol.* 2000, **35**, 307-316.

[58] Zhu M, Bowden GT. Molecular mechanism(s) for UV-B irradiation-induced glutathione depletion in cultured human keratinocytes. *Photochem. Photobiol.* 2004, **80**, 191-196.

- [59] Yokozawa T, Kim YJ. Piceatannol inhibits melanogenesis by its antioxidative actions. *Biol. Pharm. Bull.* 2007, **30**, 2007-2011.
- [60] Larsson P, Andersson E, Johansson U, Ollinger K, Rosdahl I. Ultraviolet A and B affect human melanocytes and keratinocytes differently. A study of oxidative alterations and apoptosis. *Exp. Dermatol.* 2005, **14**, 117-123.
- [61] Brenneisen P, Wenk J, Wlaschek M, Krieg T, Scharffetter-Kochanek K. Activation of p70 ribosomal protein S6 kinase is an essential step in the DNA damage-dependent signaling pathway responsible for the ultraviolet B-mediated increase in interstitial collagenase (MMP-1) and stromelysin-1 (MMP-3) protein levels in human dermal fibroblasts. *J. Biol. Chem.* 2000, **275**, 4336-4344.
- [62] Piotrowska H, Kucinska M, Murias M. Biological activity of piceatannol: Leaving the shadow of resveratrol. *Mutat. Res.* 2012, **750**, 60-82.
- [63] Ashikawa K, Majumdar S, Banerjee S, Bharti AC, Shishodia S, Aggarwal BB. Piceatannol inhibits TNF-induced NF-kappaB activation and NF-kappaB-mediated gene expression through suppression of



- IkappaBalpha kinase and p65 phosphorylation. *J. Immunol.* 2002, **169**, 6490-6497.
- [64] Su L, David M. Distinct mechanisms of STAT phosphorylation via the interferon-alpha/beta receptor. Selective inhibition of STAT3 and STAT5 by piceatannol. *J. Biol. Chem.* 2000, **275**, 12661-12666.
- [65] Geahlen RL, McLaughlin JL. Piceatannol (3,4,3',5'-tetrahydroxy-*trans*-stilbene) is a naturally occurring protein-tyrosine kinase inhibitor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1989, **165**, 241-245.
- [66] Kim S, Kim Y, Lee Y, Chung JH. Ceramide accelerates ultraviolet-induced MMP-1 expression through JAK1/STAT-1 pathway in cultured human dermal fibroblasts. *J. Lipid Res.* 2008, **49**, 2571-2581.
- [67] Kim S, Jin Y, Choi Y, Park T. Resveratrol exerts anti-obesity effects via mechanisms involving down-regulation of adipogenic and inflammatory processes in mice. *Biochem. Pharmacol.* 2011, **81**, 1343-1351.
- [68] Cho SJ, Jung UJ, Choi MS. Differential effects of low-dose resveratrol on adiposity and hepatic steatosis in diet-induced obese mice. *Br. J. Nutr.* 2012, **108**, 2166-2175.

- [69] Brasnyó P, Molnár GA, Mohás M, Markó L, Laczy B, Cseh J, Mikolás E, Szijártó IA, Mérei A, Halmai R, Mészáros LG, Sümegi B, Wittmann I. Resveratrol improves insulin sensitivity, reduces oxidative stress and activates the Akt pathway in type 2 diabetic patients. *Br. J. Nutr.* 2011, **106**, 383-389.
- [70] Bhatt JK, Thomas S, Nanjan MJ. Resveratrol supplementation improves glycemic control in type 2 diabetes mellitus. *Nutr. Res.* 2012, **32**, 537-541.
- [71] Cantos E, Espín JC, Fernández MJ, Oliva J, Tomás-Barberán FA. Postharvest UV-C-irradiated grapes as a potential source for producing stilbene-enriched red wines. *J. Agric. Food Chem.* 2003, **51**, 1208-1214.
- [72] Maruki-Uchida H, Kurita I, Sugiyama K, Sai M, Maeda K, Ito T. The protective effects of piceatannol from passion fruit (*Passiflora edulis*) seeds in UVB-irradiated keratinocytes. *Biol. Pharm. Bull.* 2013, **36**, 845-849.
- [73] Kunst A, Draeger B, Ziegehorn J. UV-methods with hexokinase and glucose-6-phosphate dehydrogenase. *In Methods of Enzymatic Analysis.* (Bergmeyer H ed.), Verlag Chemie Weinheim, 1983, pp.163-172.

- [74] Qiao Y, Sun J, Xia S, Tang X, Shi Y, Le G. Effects of resveratrol on gut microbiota and fat storage in a mouse model with high-fat-induced obesity. *Food Funct.* 2014, **5**, 1241-1249.
- [75] Kwon JY, Seo SG, Heo YS, Yue S, Cheng JX, Lee KW, Kim KH. Piceatannol, natural polyphenolic stilbene, inhibits adipogenesis *via* modulation of mitotic clonal expansion and insulin receptor-dependent insulin signaling in early phase of differentiation. *J. Biol. Chem.* 2012, **287**, 11566-11578.
- [76] Price NL, Gomes AP, Ling AJ, Duarte FV, Martin-Montalvo A, North BJ, Agarwal B, Ye L, Ramadori G, Teodoro JS, Hubbard BP, Varela AT, Davis JG, Varamini B, Hafner A, Moaddel R, Rolo AP, Coppari R, Palmeira CM, de Cabo R, Baur JA, Sinclair DA. SIRT1 is required for AMPK activation and the beneficial effects of resveratrol on mitochondrial function. *Cell Metab.* 2012, **15**, 675-690.
- [77] Minakawa M, Miura Y, Yagasaki K. Piceatannol, a resveratrol derivative, promotes glucose uptake through glucose transporter 4 translocation to plasma membrane in L6 myocytes and suppresses blood

glucose levels in type 2 diabetic model *db/db* mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2012, **422**, 469-475.

[78] Dragan S, Andrica F, Serban MC, Timar R. Polyphenols-rich natural products for treatment of diabetes. *Curr. Med. Chem.* 2015, **22**, 14-22.

[79] Kobayashi K, Ishihara T, Khono E, Miyase T, Yoshizaki F. Constituents of stem bark of *Callistemon rigidus* showing inhibitory effects on mouse alpha-amylase activity. *Biol. Pharm. Bull.* 2006, **29**, 1275-1277.

[80] Lichtenstein AH, Appel LJ, Brands M, Carnethon M, Daniels S, Franch HA, Franklin B, Kris-Etherton P, Harris WS, Howard B, Karanja N, Lefevre M, Rudel L, Sacks F, Van Horn L, Winston M, Wylie-Rosett J. Diet and lifestyle recommendations revision 2006: a scientific statement from the American Heart Association Nutrition Committee. *Circulation* 2006, **114**, 82-96.

[81] Petrovski G, Gurusamy N, Das DK. Resveratrol in cardiovascular health and disease. *Ann. NY Acad. Sci.* 2011, **1215**, 22-33.

[82] Djoko B, Chiou RY, Shee JJ, Liu YW. Characterization of immunological activities of peanut stilbenoids, arachidin-1, piceatannol,

and resveratrol on lipopolysaccharide-induced inflammation of RAW 264.7 macrophages. *J. Agric. Food Chem.* 2007, **55**, 2376-2383.

[83] Das S, Alagappan VK, Bagchi D, Sharma HS, Maulik N, Das DK. Coordinated induction of iNOS-VEGF-KDR-eNOS after resveratrol consumption: a potential mechanism for resveratrol preconditioning of the heart. *Vascul. Pharmacol.* 2005, **42**, 281-289.

[84] Naderali EK, Doyle PJ, Williams G. Resveratrol induces vasorelaxation of mesenteric and uterine arteries from female guinea-pigs. *Clin. Sci.* 2000, **98**, 537-543.

[85] Pace-Asciak CR, Hahn S, Diamandis EP, Soleas G, Goldberg DM. The red wine phenolics trans-resveratrol and quercetin block human platelet aggregation and eicosanoid synthesis: implications for protection against coronary heart disease. *Clin. Chim. Acta.* 1995, **235**, 207-219.

[86] Matsumoto Y, Gotoh N, Sano S, Sugiyama K, Ito T, Abe Y, Katano Y, Ishihata A. Effects of scirpusin B, a polyphenol in passion fruit seeds, on the coronary circulation of the isolated perfused rat heart. *Int. J. Med. Res. Health Sci.* 2014, **3**, 547-553.

- [87] Uchida-Maruki H, Inagaki H, Ito R, Kurita I, Sai M, Ito T. Piceatannol lowers the blood glucose level in diabetic mice. *Biol. Pharm. Bull.* 2015, **38**, 629-633.
- [88] Doggrell SA, Brown L. Rat models of hypertension, cardiac hypertrophy and failure. *Cardiovasc. Res.* 1998, **39**, 89-105.
- [89] Panchal SK, Brown L. Rodent models for metabolic syndrome research. *J. Biomed. Biotechnol.* 2011, **2011**, 351982.
- [90] Burdeos GC, Nakagawa K, Kimura F, Miyazawa T. Tocotrienol attenuates triglyceride accumulation in HepG2 cells and F344 rats. *Lipids* 2012, **47**, 471-481.
- [91] Manach C, Scalbert A, Morand C, Rémésy C, Jiménez L. Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am. J. Clin. Nutr.* 2004, **79**, 727-747.
- [92] Hijona E, Aguirre L, Pérez-Matute P, Villanueva-Millán MJ, Mosqueda-Solis A, Hasnaoui M, Nepveu F, Senard JM, Bujanda L, Aldámiz-Echevarría L, Llarena M, Andrade F, Perio P, Leboulanger F, Hijona L, Arbones-Mainar JM, Portillo MP, Carpéné C. Limited beneficial effects of piceatannol supplementation on obesity

complications in the obese Zucker rat: gut microbiota, metabolic, endocrine, and cardiac aspects. *J. Physiol. Biochem.* 2016, **72**, 567-82.

[93] Lind L. Lipids and endothelium-dependent vasodilation-a review. *Lipids* 2002, **37**, 1-15.

[94] Gawaz M, Langer H, May AE. Platelets in inflammation and atherogenesis. *J. Clin. Invest.* 2005, **115**, 3378-3384.

[95] Panchal SK, Poudyal H, Iyer A, Nazer R, Alam MA, Diwan V, Kauter K, Sernia C, Campbell F, Ward L, Gobe G, Fenning A, Brown L. High-carbohydrate, high-fat diet-induced metabolic syndrome and cardiovascular remodeling in rats. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 2011, **57**, 611-624.

[96] Poudyal H, Campbell F, Brown L. Olive leaf extract attenuates cardiac, hepatic, and metabolic changes in high carbohydrate-, high fat-fed rats. *J. Nutr.* 2010, **140**, 946-953.

[97] Xie HC<sup>1</sup>, Han HP<sup>1</sup>, Chen Z<sup>2</sup>, He JP<sup>3</sup>. A study on the effect of resveratrol on lipid metabolism in hyperlipidemic mice. *Afr. J. Tradit. Complement Altern. Med.* 2013, **11**, 209-212.

- [98] Louis XL, Thandapilly SJ, MohanKumar SK, Yu L, Taylor CG, Zahradka P, Netticadan T. Treatment with low-dose resveratrol reverses cardiac impairment in obese prone but not in obese resistant rats. *J. Nutr. Biochem.* 2012, **23**, 1163-1169.
- [99] Baur JA1, Sinclair DA. Therapeutic potential of resveratrol: the *in vivo* evidence. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2006, **5**, 493-506.
- [100] Wang Z, Huang Y, Zou J, Cao K, Xu Y, Wu JM. Effects of red wine and wine polyphenol resveratrol on platelet aggregation *in vivo* and *in vitro*. *Int. J. Mol. Med.* 2002, **9**, 77-79.
- [101] Bhatt SR, Lokhandwala MF, Banday AA. Resveratrol prevents endothelial nitric oxide synthase uncoupling and attenuates development of hypertension in spontaneously hypertensive rats. *Eur. J. Pharmacol.* 2011, **667**, 258-264.
- [102] Aubin MC, Lajoie C, Clément R, Gosselin H, Calderone A, Perrault LP. Female rats fed a high-fat diet were associated with vascular dysfunction and cardiac fibrosis in the absence of overt obesity and hyperlipidemia: therapeutic potential of resveratrol. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2008, **325**, 961-968.



- [103] Rush JW, Quadrilatero J, Levy AS, Ford RJ. Chronic resveratrol enhances endothelium-dependent relaxation but does not alter eNOS levels in aorta of spontaneously hypertensive rats. *Exp. Biol. Med.* 2007, **232**, 814-822.
- [104] Zern TL, Wood RJ, Greene C, West KL, Liu Y, Aggarwal D, Shachter NS, Fernandez ML. Grape polyphenols exert a cardioprotective effect in pre- and postmenopausal women by lowering plasma lipids and reducing oxidative stress. *J. Nutr.* 2005, **135**, 1911-1917.
- [105] Reeves PG. Components of the AIN-93 diets as improvements in the AIN-76A diet. *J. Nutr.* **1997**, 127, 838S-841S.
- [106] 公益財団法人 日本健康・栄養食品協会 トクホごあんない 2017年版
- [107] Nagao T, Hase T, Tokimitsu I. A green tea extract high in catechins reduces body fat and cardiovascular risks in humans. *Obesity.* 2007, **5**, 1473-1483.
- [108] Wang H, Wen Y, Du Y, Yan X, Guo H, Rycroft JA, Boon N, Kovacs EM, Mela DJ. Effects of catechin enriched green tea on body composition. *Obesity.* 2010, **18**, 773-779.

- [109] Most J, Timmers S, Warnke I, Jocken JW, van Boekschoten M, de Groot P, Bendik I, Schrauwen P, Goossens GH, Blaak EE. Combined epigallocatechin-3-gallate and resveratrol supplementation for 12 wk increases mitochondrial capacity and fat oxidation, but not insulin sensitivity, in obese humans: a randomized controlled trial. *Am. J. Clin. Nutr.* 2016, **104**, 215-227.
- [110] Suzuki T, Pervin M, Goto S, Isemura M, Nakamura Y. Beneficial effects of tea and the green tea catechin epigallocatechin-3-gallate on obesity. *Molecules* 2016, **29**, 21.
- [111] Brown AL, Lane J, Coverly J, Stocks J, Jackson S, Stephen A, Bluck L, Coward A, Hendrickx H. Effects of dietary supplementation with the green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate on insulin resistance and associated metabolic risk factors: randomized controlled trial. *Br. J. Nutr.* 2009, **101**, 886-894.
- [112] Dostal AM, Arikawa A, Espejo L, Kurzer MS. Long-term supplementation of green tea extract does not modify adiposity or bone mineral density in a randomized trial of overweight and obese postmenopausal women. *J. Nutr.* 2016, **146**, 256-264.

- [113] 消費者庁 機能性表示食品に関する情報  
<http://www.caa.go.jp/foods/index23.html>
- [114] Piver B, Fer M, Vitrac X, Merillon JM, Dreano Y, Berthou F, Lucas D. Involvement of cytochrome P450 1A2 in the biotransformation of trans-resveratrol in human liver microsomes. *Biochem. Pharmacol.* 2004, **68**, 773-782.
- [115] Safety of synthetic trans-resveratrol as a novel food pursuant to Regulation (EC) No 258/97. *EFSA J.* 2016, **14**, 4368
- [116] Shiratake S, Nakahara T, Iwahashi H, Onodera T, Mizushima Y. Rose myrtle (*Rhodomyrtus tomentosa*) extract and its component, piceatannol, enhance the activity of DNA polymerase and suppress the inflammatory response elicited by UVB-induced DNA damage in skin cells. *Mol. Med. Rep.* 2015, **12**, 5857-5864.
- [117] Bravo K, Duque L, Ferreres F, Moreno DA, Osorio E. *Passiflora tarminiana* fruits reduce UVB-induced photoaging in human skin fibroblasts. *J. Photochem. Photobiol. B.* 2017, **168**, 78-88.
- [118] Tung YC, Lin YH, Chen HJ, Chou SC, Cheng AC, Kalyanam N, Ho CT, Pan MH. Piceatannol exerts anti-obesity effects in C57BL/6 mice

through modulating adipogenic proteins and gut microbiota. *Molecules* 2016, **21**, pii: E1419.

- [119] Rivera L, Morón R, Zarzuelo A, Galisteo M. Long-term resveratrol administration reduces metabolic disturbances and lowers blood pressure in obese Zucker rats. *Biochem. Pharmacol.* 2009, **77**, 1053-1063.
- [120] Kang W, Hong HJ, Guan J, Kim DG, Yang EJ, Koh G, Park D, Han CH, Lee YJ, Lee DH. Resveratrol improves insulin signaling in a tissue-specific manner under insulin-resistant conditions only: *in vitro* and *in vivo* experiments in rodents. *Metabolism* 2012, **61**, 424-433.
- [121] Inoue H, Nakata R. PPAR  $\alpha$  を介したレスベラトロールの作用機構と系統差の相違 日本家政学会 2011, session ID: 3C-7
- [122] Oritani Y, Okitsu T, Nishimura E, Sai M, Ito T, Takeuchi S. Enhanced glucose tolerance by intravascularly administered piceatannol in freely moving healthy rats. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2016, **470**, 753-758.
- [123] Zhang AJ, Rimando AM, Mizuno CS, Mathews ST.  $\alpha$ -Glucosidase inhibitory effect of resveratrol and piceatannol. *J. Nutr. Biochem.* 2017, **47**, 86-93.

- [124] Borgohain MP, Lahkar M, Ahmed S, Chowdhury L, Kumar S, Pant R, Choubey A. Small molecule inhibiting nuclear factor-kB ameliorates oxidative stress and suppresses renal inflammation in early stage of alloxan-induced diabetic nephropathy in rat. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* 2017, **120**, 442-449.
- [125] Llarena M, Andrade F, Hasnaoui M, Portillo MP, Pérez-Matute P, Arbones-Mainar JM, Hijona E, Villanueva-Millán MJ, Aguirre L, Carpéné C, Aldámiz-Echevarría L. Potential renoprotective effects of piceatannol in ameliorating the early-stage nephropathy associated with obesity in obese Zucker rats. *J. Physiol. Biochem.* 2016, **72**, 555-566.
- [126] Hung LM, Chen JK, Lee RS, Liang HC, Su MJ. Beneficial effects of astringinin, a resveratrol analogue, on the ischemia and reperfusion damage in rat heart. *Free Radic. Boil. Med.* 2001, **30**, 877-883.
- [127] Chen WP, Hung LM, Hsueh CH, Lai LP, Su MJ. Piceatannol, a derivative of resveratrol, moderately slows  $I_{Na}$  inactivation and exerts antiarrhythmic action in ischaemia-reperfused rat hearts. *Br. J. Pharmacol.* 2009, **157**, 381-391.

- [128] Kee HJ, Park S, Kang W, Lim KS, Kim JH, Ahn Y, Jeong MH. Piceatannol attenuates cardiac hypertrophy in an animal model through regulation of the expression and binding of the transcription factor GATA binding factor 6. *FEBS Lett.* 2014, **588**, 1529-1536.
- [129] Nguyen MC, Ryoo S. Intravenous administration of piceatannol, an arginase inhibitor, improves endothelial dysfunction in aged mice. *Korean J. Physiol. Pharmacol.* 2017, **21**, 83-90.
- [130] Kahyo T, Ichikawa S, Hatanaka T, Yamada MK, Setou M. A novel chalcone polyphenol inhibits the deacetylase activity of SIRT1 and cell growth in HEK293T cells. *J. Pharmacol. Sci.* 2008, **108**, 364-371.
- [131] Minakawa M, Kawano A, Miura Y, Yagasaki K. Hypoglycemic effect of resveratrol in type 2 diabetic model *db/db* mice and its actions in cultured L6 myotubes and RIN-5F pancreatic  $\beta$ -cells. *J. Clin. Biochem. Nutr.* 2011, **48**, 237-244.
- [132] Youn J, Lee JS, Na HK, Kundu JK, Surh YJ. Resveratrol and piceatannol inhibit iNOS expression and NF- $\kappa$ B activation in dextran sulfate sodium-induced mouse colitis. *Nutr. Cancer* 2009, **61**, 847-854.

- [133] Arai D, Kataoka R, Otsuka S, Kawamura M, Maruki-Uchida H, Sai M, Ito T, Nakao Y. Piceatannol is superior to resveratrol in promoting neural stem cell differentiation into astrocytes. *Food Funct.* 2016, **7**, 4432-4441.
- [134] Matsumura Y, Nakagawa Y, Mikome K, Yamamoto H, Osakabe N. Enhancement of energy expenditure following a single oral dose of flavan-3-ols associated with an increase in catecholamine secretion. *PLoS One* 2014, **9**, e112180.
- [135] Ikarashi N, Ogawa S, Hirobe R, Kon R, Kusunoki Y, Yamashita M, Mizukami N, Kaneko M, Wakui N, Machida Y, Sugiyama K. Epigallocatechin gallate induces a hepatospecific decrease in the CYP3A expression level by altering intestinal flora. *Eur. J. Pharm. Sci.* 2017, **100**, 211-218.

## 謝辞

本研究を行うにあたり、終始御懇篤なる御指導、御鞭撻を賜りました、筑波大学生命環境系教授 繁森 英幸博士、准教授 吉田 滋樹博士、准教授 臼井 健郎博士、准教授 山田 小須弥博士に謹んで感謝の意を表します。

本研究を行うにあたり、終始御懇篤なる御指導、御鞭撻を賜りました、山形大学医学部看護学科教授 石幡 明博士、同名誉教授 片野 由美博士、同研究室 後藤 のぞみさん、菅野 純果さん、阿曾 吉孝さん、富樫 聡志さん、東京工科大学応用生物学部教授 前田 憲寿博士、森永製菓研究所 杉山 謙吉研究員、森永製菓健康事業本部 伊藤 建比古博士、齋 政彦研究員、稲垣 宏之博士、伊藤 良一研究員、栗田 郁子研究員に謹んで感謝の意を表します。

本研究を行うにあたり、常に惜しめない御指導、御援助を賜りました、森永製菓の同僚の方々に深く感謝の意を表します。

最後に、常に最大限の協力を与え、支えとなってくれた家族、友人達に心から感謝いたします。