

ifia JAPAN 2016 展示会場ホール内セミナー [HFE セッション会場]  
ブドウ由来レスベラトロールの最新研究  
ブドウ由来レスベラトロール協会セミナー

# ブドウ由来レスベラトロール の健康機能と可能性

# KIRIN

2016年5月18日  
キリン株式会社  
R&D本部 ワイン技術研究所  
矢内 隆章



# 本日のアジェンダ

## レスベラトロールの心血管機能亢進と内臓脂肪蓄積抑制

### 0. フレンチ・パラドックスについて

### 1. レスベラトロールのヒト iPS 細胞由来心筋細胞への作用

: 第 69 回日本栄養・食糧学会大会 【奈良女子大学との共同研究】

### 2. レスベラトロールの抗動脈硬化作用

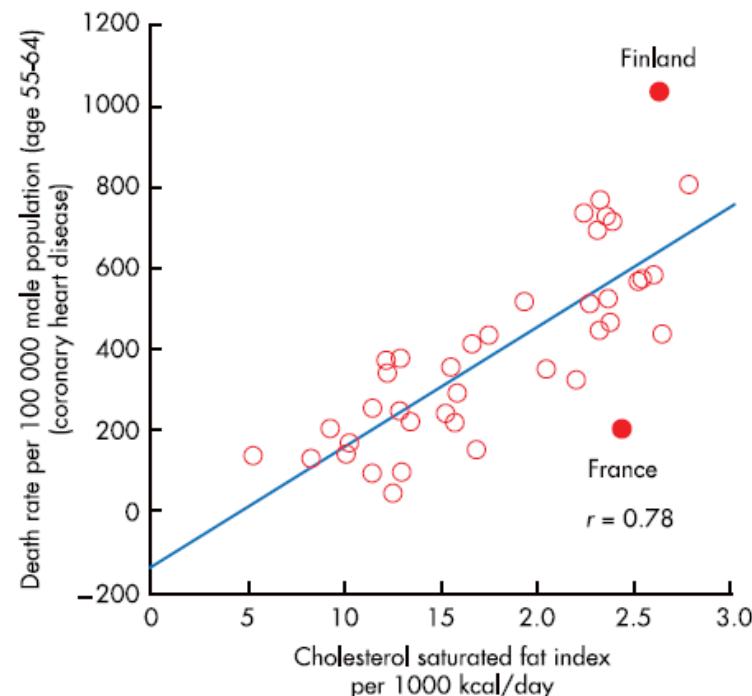
: 第 88 回日本生化学会大会 【奈良女子大学との共同研究】

### 3. レスベラトロールの内臓脂肪蓄積抑制メカニズム

: *Front Pharmacol* 2015; 6: 199. 【三重大学との共同研究】

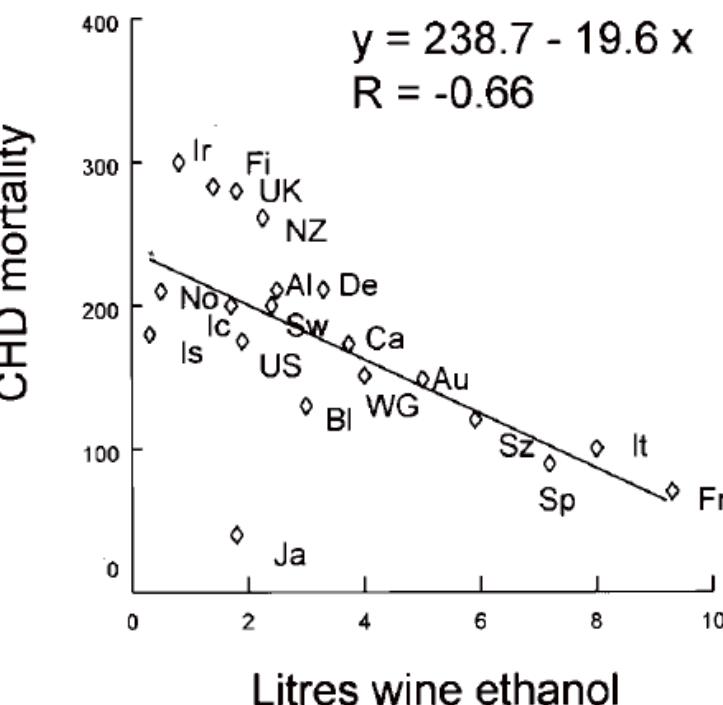
# フレンチ・パラドックス

- ① 飽和脂肪酸とコレステロールの摂取量と虚血性心疾患による死亡率には正の相関関係がある
- ② 動物性脂肪の多めの食事をしているフランスは、この相関性から外れ、虚血性心疾患による死亡率が低い（フレンチ・パラドックス）、この現象はワインの消費量に関連づけられている  
⇒ 虚血性心疾患の主因は血管の動脈硬化、心血管機能に関するレスベラトロールの効果が注目



$$CSI = (1.01 \times g \text{ saturated fat}) + (0.05 \times mg \text{ cholesterol})$$

Circulation 1993; 88: 2771-2779.



Lancet 1994; 344: 1719-1723.

# 今日のアジェンダ

## 1. レスベラトロールのヒト iPS 細胞由来心筋細胞への作用

：2015年 第 69 回日本栄養・食糧学会大会 【奈良女子大学との共同研究】

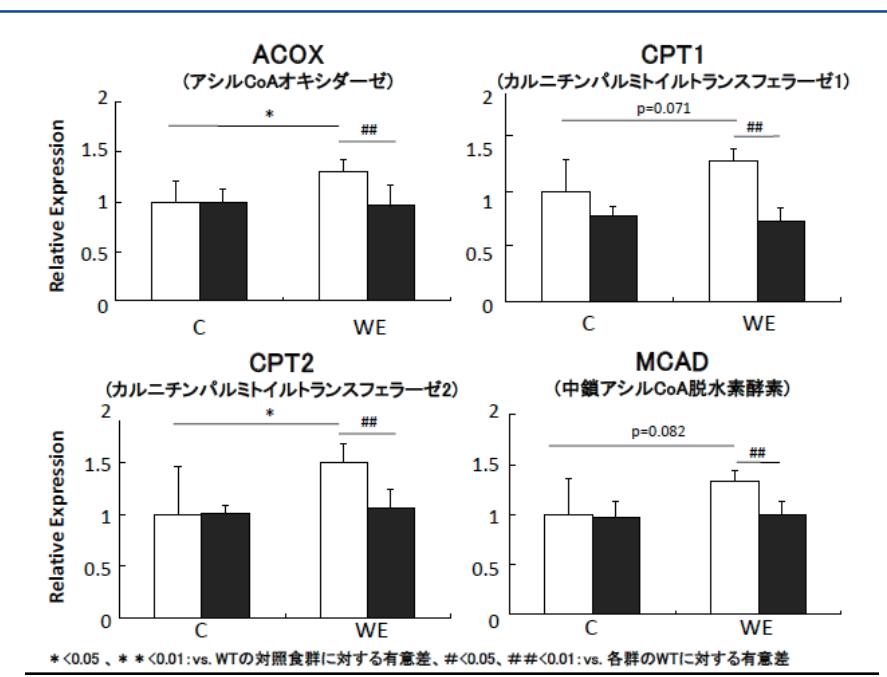
【目的】ヒト iPS 細胞由来心筋細胞にレスベラトロール (*t*-RES) を作用させ、心臓の機能維持に関連する“フレンチ・パラドックス”への *t*-RES の関与を明らかにする。

# これまでの経緯・成果

## ① ワイン濃縮物の長期摂取マウス心臓の遺伝子解析

【2011年日本栄養・食糧学会】

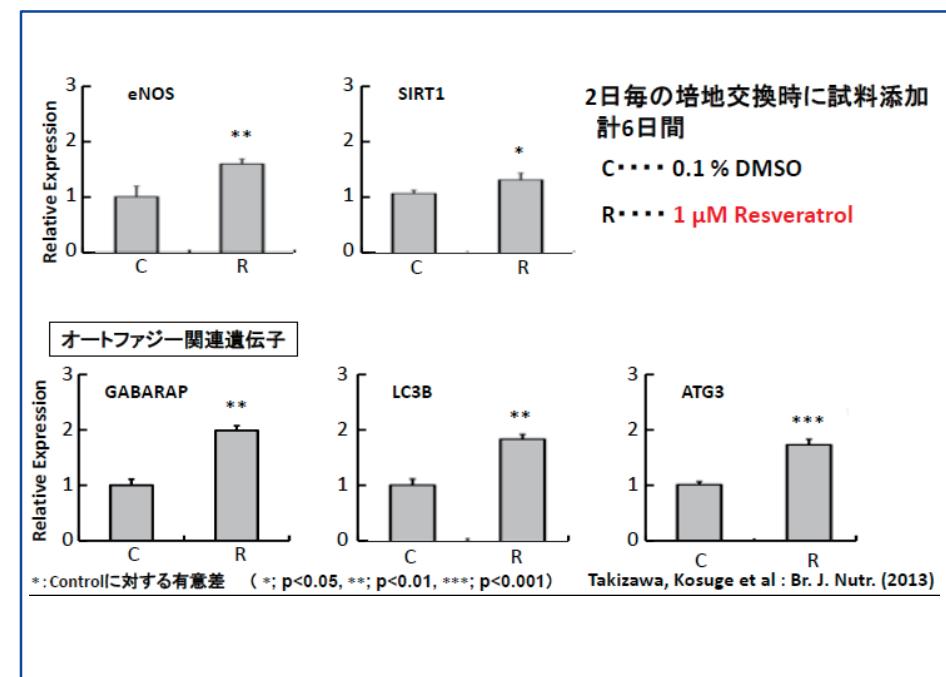
:ワイン濃縮物の長期摂取(2.5%赤ワインエキス、6ヶ月)により、 $\beta$ -酸化に関わる遺伝子(ACOX,CPT1&2)及び脂肪酸輸送に関わる遺伝子(FATP1,FABP3)の発現誘導や誘導傾向 ⇒ 心臓の脂質代謝に関する遺伝子の発現亢進により血液中と細胞内の遊離脂肪酸のクリアランスに有効



## ② 低濃度t-RES処理ヒト血管内皮細胞の遺伝子解析

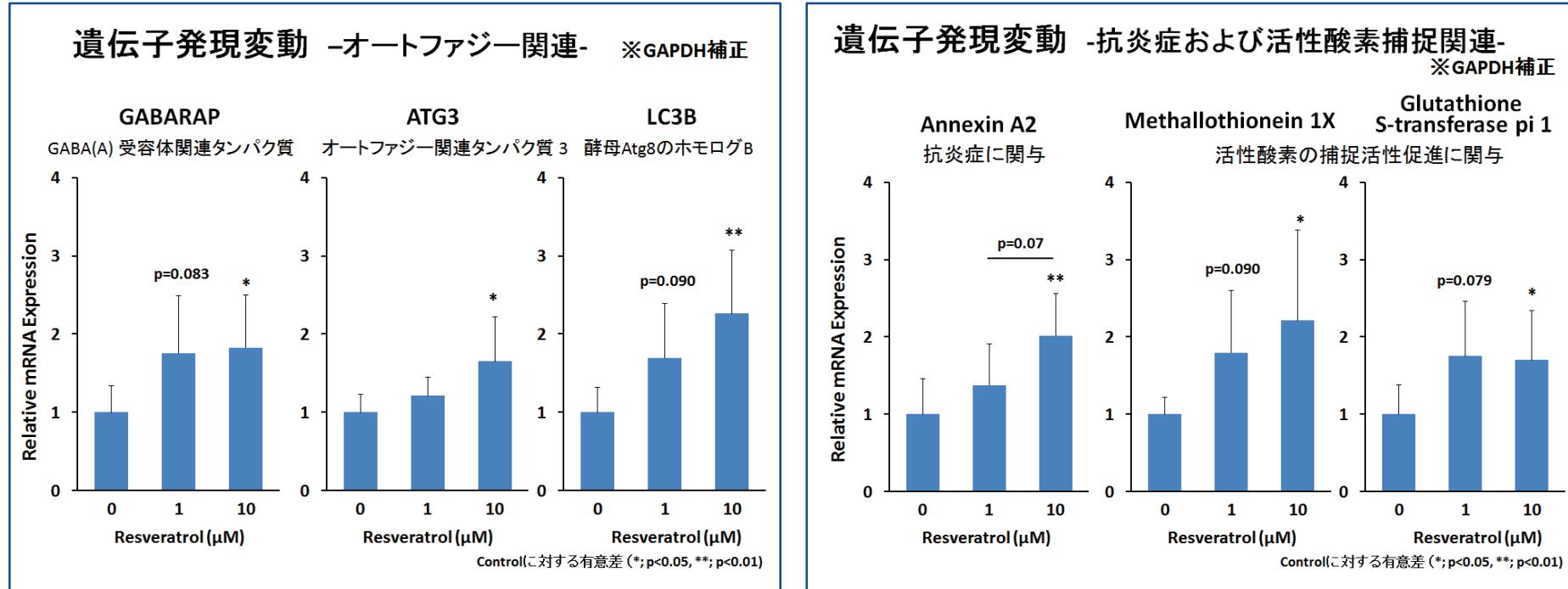
【Br. J. Nutr. (2013), 110, 2150-2155】

:t-RESはeNOSやSIRT1発現量を増加 ⇒ SIRT1を介したeNOS活性の亢進による血管拡張や血小板凝集抑制:オートファジー関連遺伝子(心筋細胞の恒常性維持)の誘導 ⇒ 血管内皮細胞のミトコンドリア機能亢進



# ヒトiPS細胞由来心筋細胞の遺伝子発現変動

- ヒトiPS細胞由来心筋細胞の培養に成功（拍動を確認）。培地にt-RESを6日間添加（終濃度:1μM、10μM）し、遺伝子の発現解析を実施



- ヒトiPS細胞由来心筋細胞において、t-RESによるオートファジー関連遺伝子（GABARAP、ATG3、LC3B）、抗炎症関連遺伝子（Annexin A2）や活性酸素捕捉関連遺伝子（Methallothionein 1X、Glutathione S-transferase pi 1）の発現誘導が認められた

# *t*-RESによるヒトiPS細胞由来心筋細胞とHUVECおよびマウス心臓の遺伝子発現変動

= ヒトiPS細胞由来心筋細胞 vs. HUVEC =

	ヒトiPS細胞由来心筋細胞		HUVEC
	Resv 1μM	Resv 10μM	Resv 1 μM
GABARAP	↑	↑↑	↑↑
ATG3	↑	↑↑	↑↑
LC3B	↑	↑↑	↑↑
ANXNA2	→	↑↑	↑↑
MT1X	↑	↑↑	↑↑
GSTP1	↑	↑↑	↑↑

オートファジー関連

抗炎症関連

活性酸素捕捉関連

= ヒトiPS細胞由来心筋細胞 vs. マウスの心筋細胞 =

	ヒトiPS細胞由来心筋細胞		マウス心臓 2.5% ワイン食、6ヶ月 ※ Resv 0.00045 % 含有
	Resv 1μM 6日間	Resv 10μM 6日間	
ACOX	↑	↑↑	↑
CPT1	→	↑↑	↑
CPT2	→	→	↑
MCAD	↑	↑	↑
MnSOD	↑	↑↑	→
SIRT1 *	→	↑↑	↑

\* PPAR応答配列をもたない遺伝子

↑ 発現が有意に増加    ↑↑ 発現が上昇傾向    → 変化なし

β-酸化関連遺伝子やSIRT1遺伝子の発現変動  
はほぼ一致

オートファジー関連遺伝子、抗炎症関連遺伝子  
や活性酸素捕捉関連遺伝子発現変動が一致

# まとめ

心筋細胞において、*t*-RESの

i) 脂質代謝の改善

ii) ミトコンドリア品質管理機能の亢進

iii) 活性酸素捕捉活性の亢進

➤ 心不全病態での異常ミトコンドリアの蓄積除去が心不全期に誘導されるオートファジーの主たる役割であることから、オートファジー活性を亢進する*t*-RESは、心筋細胞の恒常性維持に寄与することが示唆

が明らかとなり、

心臓の機能維持に関連する “フレンチ・パラドックス” の  
機序に*t*-RESが関与していることが強く示唆された。

# 本日のアジェンダ

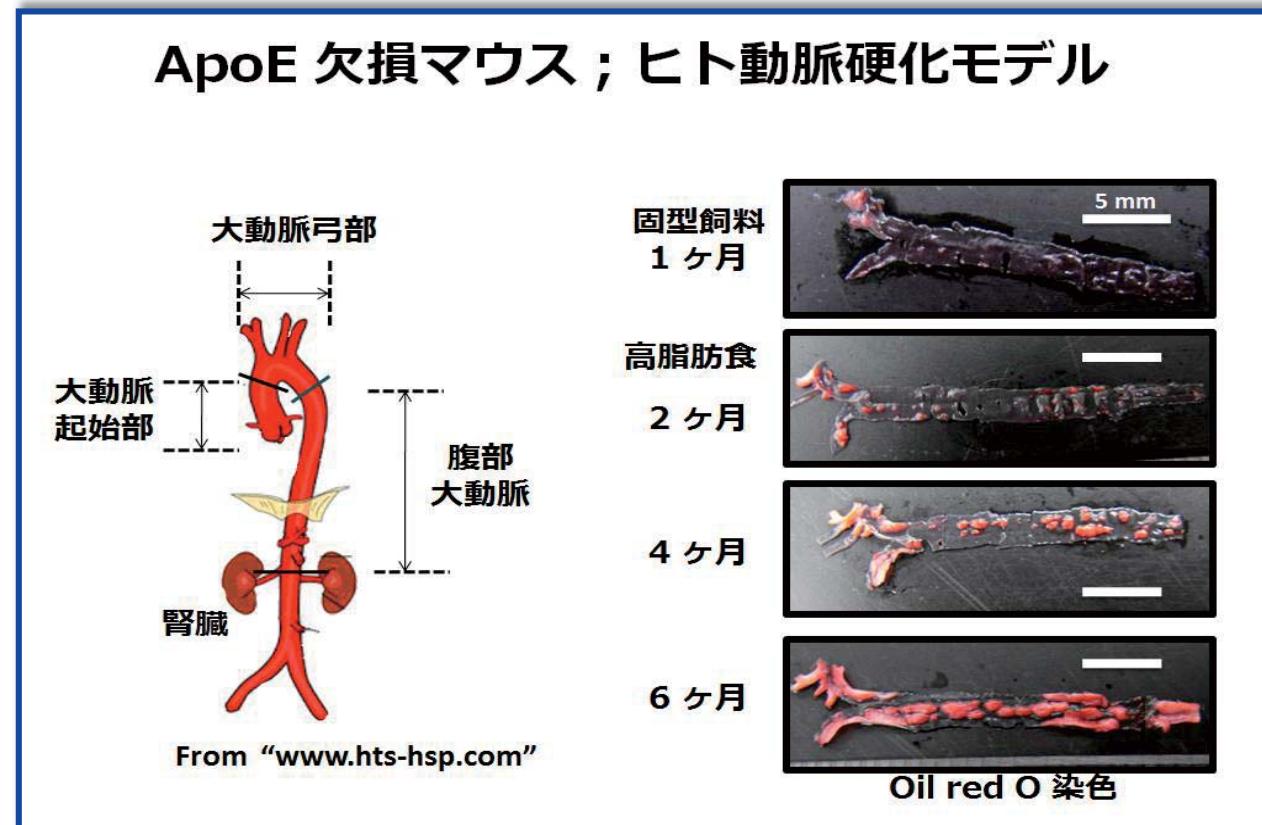
## 2. レスベラトロールの抗動脈硬化作用

：2015年 第 88 回日本生化学会大会 【奈良女子大学との共同研究】

【目的】ヒトの心臓病の約80%を占める虚血性心疾患の直接原因である動脈硬化に対し、ヒト動脈硬化症モデル ApoE 欠損マウスにレスベラトロール (*t*-RES) を作用させ、心臓の血管維持（抗動脈硬化）に関連する“フレンチ・パラドックス”への *t*-RES の関与を明らかにする。

# ヒト動脈硬化モデル ApoE 欠損マウスの特徴

目的：ヒト動脈硬化モデル ApoE 欠損マウスの大動脈における赤ワインエキスおよび t-RES の抗動脈硬化効果の可視化



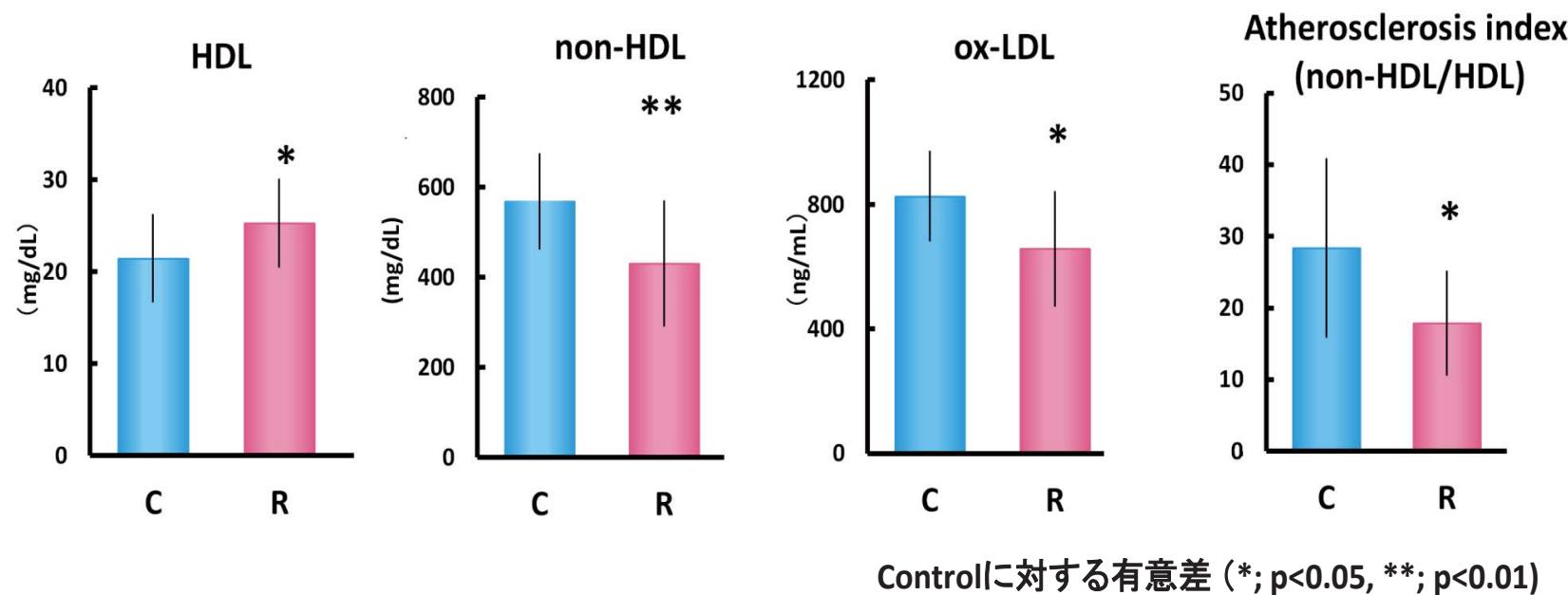
- \* 高脂肪食を摂取させたマウス大動脈に蓄積した脂質を可視化 (Oil Red O 染色)  
⇒ 飼育期間が長くなるにつれて赤く染まった面積 (脂質の沈着) が増加する

# *t*-RES は血漿コレステロールに影響を与える

## ➤ 血漿生化学的パラメーターの解析

: 0.05% *t*-RES 含有餌を 3 カ月間摂取

- ① 抗動脈硬化作用のある HDL-コレステロール濃度は上昇
- ② non-HDL コレステロール濃度、心血管系疾患との関連が指摘される酸化 LDL 濃度および動脈硬化指数の non-HDL/HDL 比は、いずれもレスベラトロールで低下



# 赤ワインエキスや t-RES は抗動脈硬化効果を示す

## ➤ 動脈硬化の病理的特徴（動脈内膜内の脂質沈着とマクロファージ浸潤）への効果

： 5 %赤ワインエキス（含有0.05% t-RES）と 0.05% t-RES 含有餌を 3 カ月間摂取

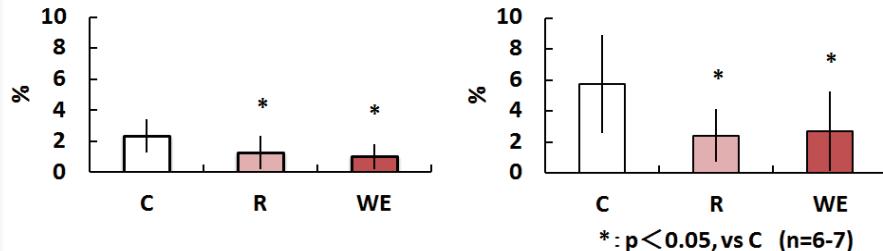
- ① 大動脈および弓部の脂質蓄積面積（Oil red O 染色）の減少と血管肥厚の抑制
- ② 病変部へのマクロファージ浸潤（マクロファージ特異的抗体 Mac-2 抗体による免疫染色）の抑制

### 相対病変面積（Oil red O 染色部位）の画像解析

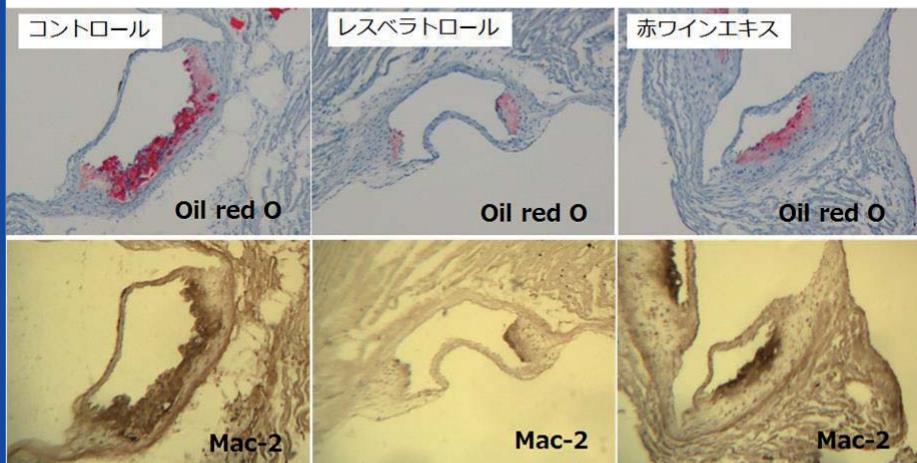


$$\text{相対病変面積(%)} = \frac{\text{病変面積}}{\text{全体面積}}$$

全体



### 大動脈の組織染色



\* レスベラトロールや赤ワインエキスを摂取すると  
血管内膜肥厚と脂質沈着ならびマクロファージ浸潤は抑制

# まとめ

ヒト動脈硬化モデルにおいて、*t*-RESの

## i) 血漿コレステロールの改善

- ① HDL-コレステロール濃度の増加
- ② 酸化LDLコレステロール濃度の減少

## ii) 動脈内の動脈硬化病変部の改善

- ① 血管内壁への脂肪の蓄積抑制
- ② 血管肥厚と炎症抑制

➤ LDLコレステロールの酸化を抑制することが動脈硬化の予防となることから、血液中の酸化LDLコレステロール濃度を減少させる *t*-RES は、動脈硬化を予防するとともに動脈硬化の進展も抑制する可能性が示唆

が明らかとなり、

心臓の血管維持に関連する “フレンチ・パラドックス” の  
機序に*t*-RESが関与していることが強く示唆された。

# 本日のアジェンダ

## 3. レスベラトロールの内臓脂肪蓄積抑制メカニズム

: *Front Pharmacol* 2015; 6: 199.

【三重大学との共同研究】

【背景】① *t*-RES の健康機能効果として、老化のコントロールや抗肥満効果の受容性を確認（メルシャン調べ）。

② 抗老化の標的として血管と脂肪細胞に着目すると、血管の老化は動脈硬化のリスクを、脂肪細胞の老化は内臓脂肪蓄積のリスクを高める。

③ 肥満や肥満傾向は心疾患による死亡のリスクを高めるが、欧米諸国の中で、フランス人は成人肥満比率が低い。

【目的】ヒト肥満症との類似性が認められる食餌性肥満モデルのゼブラフィッシュにレスベラトロール (*t*-RES) を摂取させ、心疾患のリスクに関連する内臓脂肪の蓄積（肥満）抑制に関する *t*-RES の関与を明らかにする。

# 肥満モデルとしてのゼブラフィッシュ ( ZF ; *MieKomachi001* ) の特徴

- 三重大院医学系研究科田中教授のチームが独自に開発
- ヒトとのゲノム間の相同性は70~80%
- ヒトと類似する臓器（消化器官、脂肪組織、筋肉組織）と内分泌機構（レプチニン、アディポネクチン、インスリンなど）を持つ
- ヒト肥満症と類似性が確認
- 生きたままの内臓脂肪を染色  
：内臓脂肪の蓄積状態を視覚的に評価  
& 画像解析による脂肪量の定量化が可能

上：食餌で肥満誘導のゼブラフィッシュ MK001

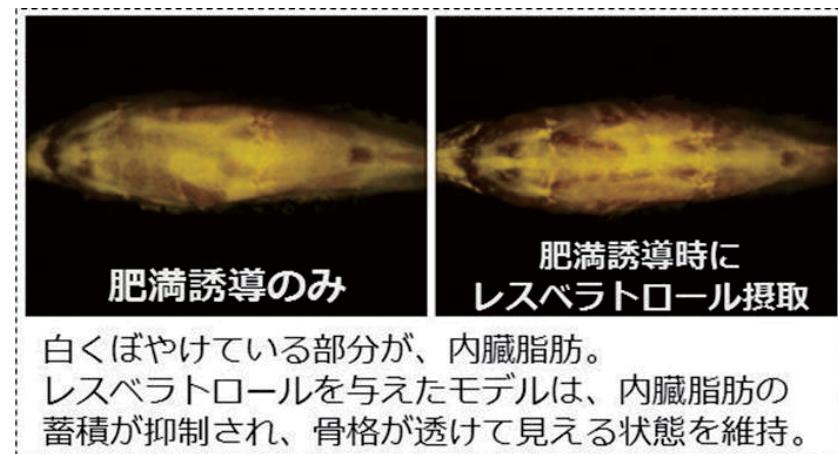
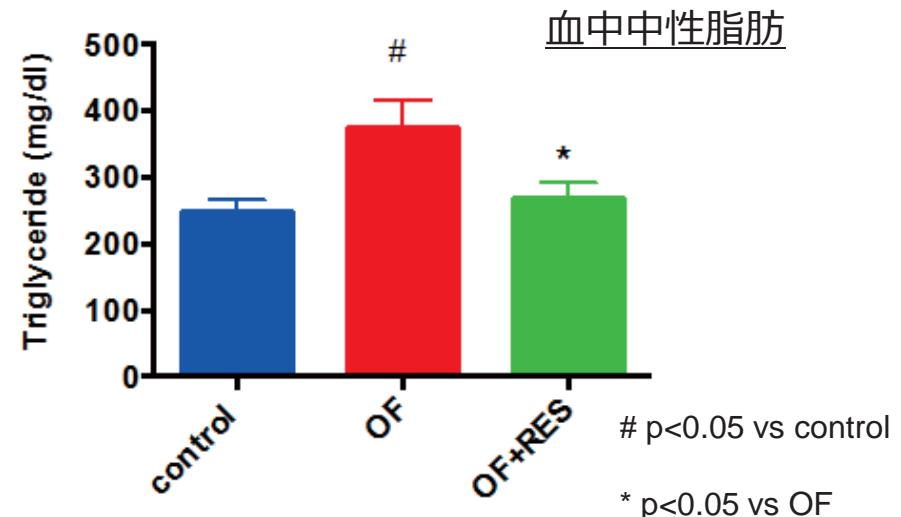
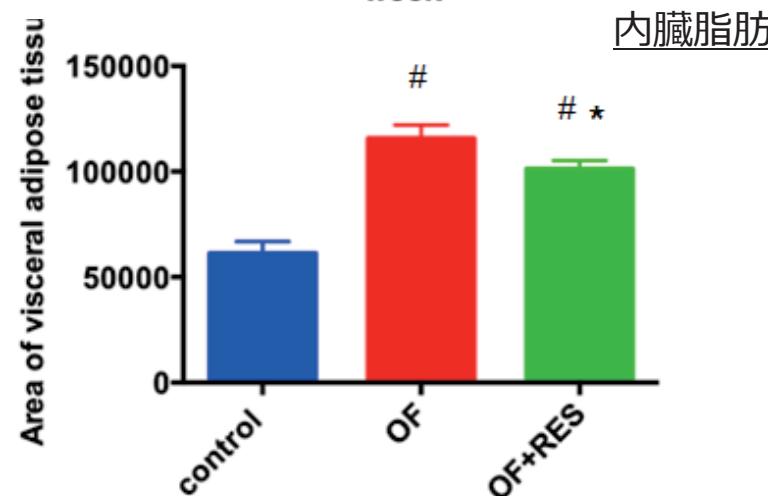
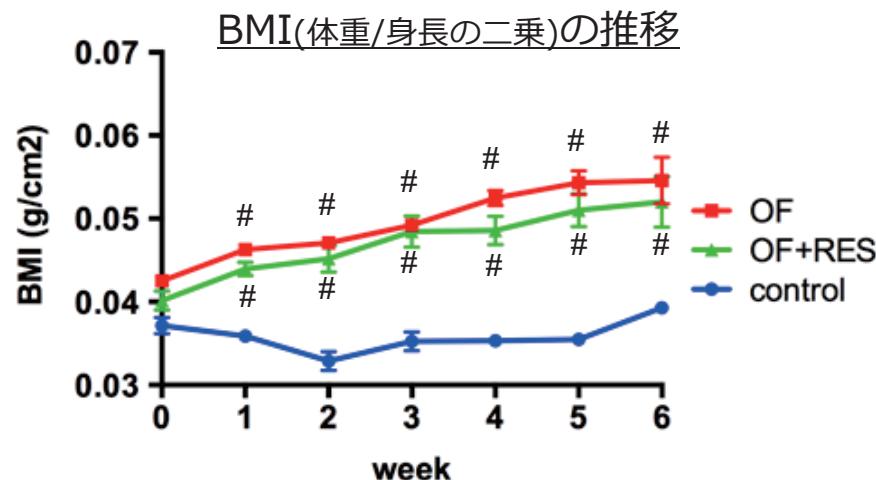


下：通常食餌のゼブラフィッシュ MK001

# *t*-RES は過食時の内臓脂肪の蓄積を抑制

目的 : *t*-RES の内臓脂肪蓄積抑制の可視化データの取得

- ZF (MK001) に RES (40 mg/kg-BW/day) を含有する餌を5週間摂取



# *t*-RES と CR に共通する転写制御ネットワーク

目的 : *t*-RES の内臓脂肪蓄積抑制のメカニズム解析

仮説 : a) カロリー制限 (CR) は SIRT1 を介して肥満を軽減することから、*t*-RES と CR には  
遺伝子レベルで共通した働きがある

b) *t*-RES 摂取の代謝に与える効果は肥満患者においてのみ認められることから、*t*-RES  
の標的は肥満患者で異常化している因子である

I ) *t*-RES と CR に共通する遺伝子の発現制御機能 (・、②) と肥満で変動する遺伝子の  
発現制御機能 (③、④) の解析

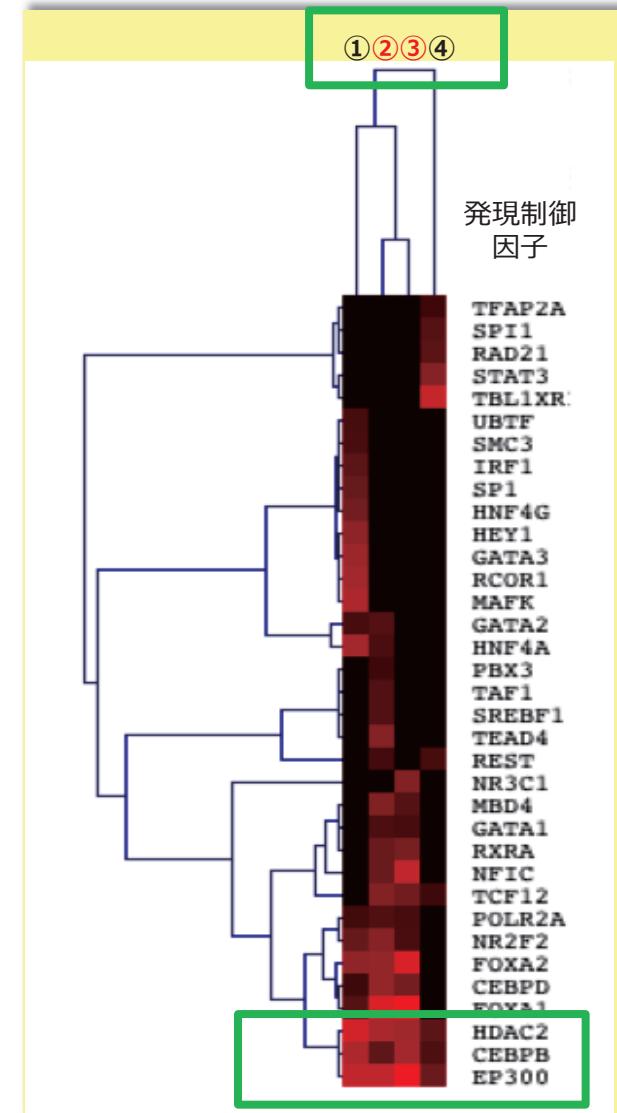
➤ ZF (MK001) に RES (40 mg/kg-BW/day) を含有する餌を5週間摂取後の内臓脂肪細胞のトランスク  
リプトーム解析を実施、発現変動遺伝子の制御因子の同定は Cytoscape と Pathway Studio を使用

	共通する発現変動遺伝子	遺伝子の発現制御因子
① ZF (内臓脂肪) : <i>t</i> -RES & CR	9	20
② ヒト肥満 (皮下脂肪) : <i>t</i> -RES & CR	7	19
③ ZF 肥満 (内臓脂肪) : オス & メス	15	14
④ ヒト肥満 (皮下脂肪) : 男性 & 女性	46	10

# 肥満の脂肪細胞では遺伝子の制御因子 ( *EP300*、*HDAC2*、*C/EBPβ* ) が異常化

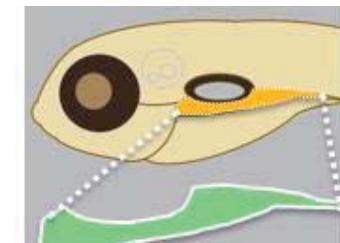
## II) 遺伝子発現制御因子の階層的クラスタリング

- ヒト肥満における *t*-RES と CR に共通する発現制御因子（②）と肥満 ZF で異常化する発現制御因子（③）に共通性が認められた。
  - ヒトと ZF の肥満において異常化し、*t*-RES や CR によりその異常が正常化する因子として、*EP300*、*HDAC2*、*C/EBPβ* が見出された。
- \* 魚からヒトの内臓脂肪蓄積（肥満）のメカニズムは共通
- \* *t*-RES の内臓脂肪蓄積（肥満）抑制のメカニズムの一部は CR と共に

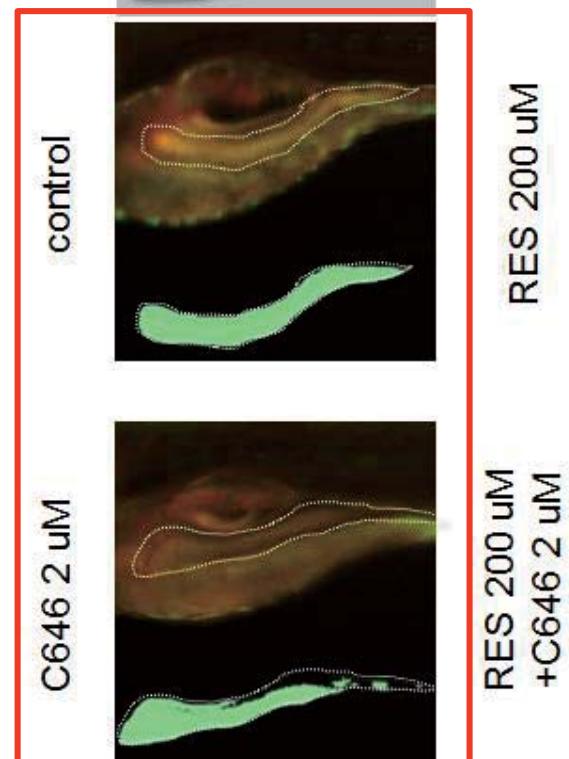


# EP300 の阻害 (C646) は腹腔内脂肪を減少

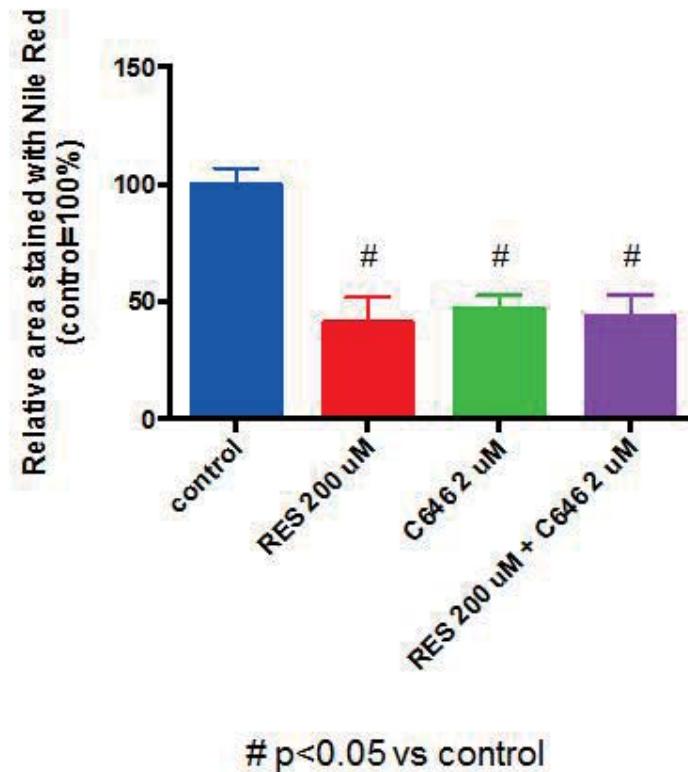
【方法】肥満誘導中の ZF に、 $2 \mu\text{M}$  C646、 $200 \mu\text{M}$  t-RES、 $2 \mu\text{M}$  C646 +  $200 \mu\text{M}$  t-RES を 48時間処理し、内臓脂肪（腹腔内脂肪）を Nile Red 染色



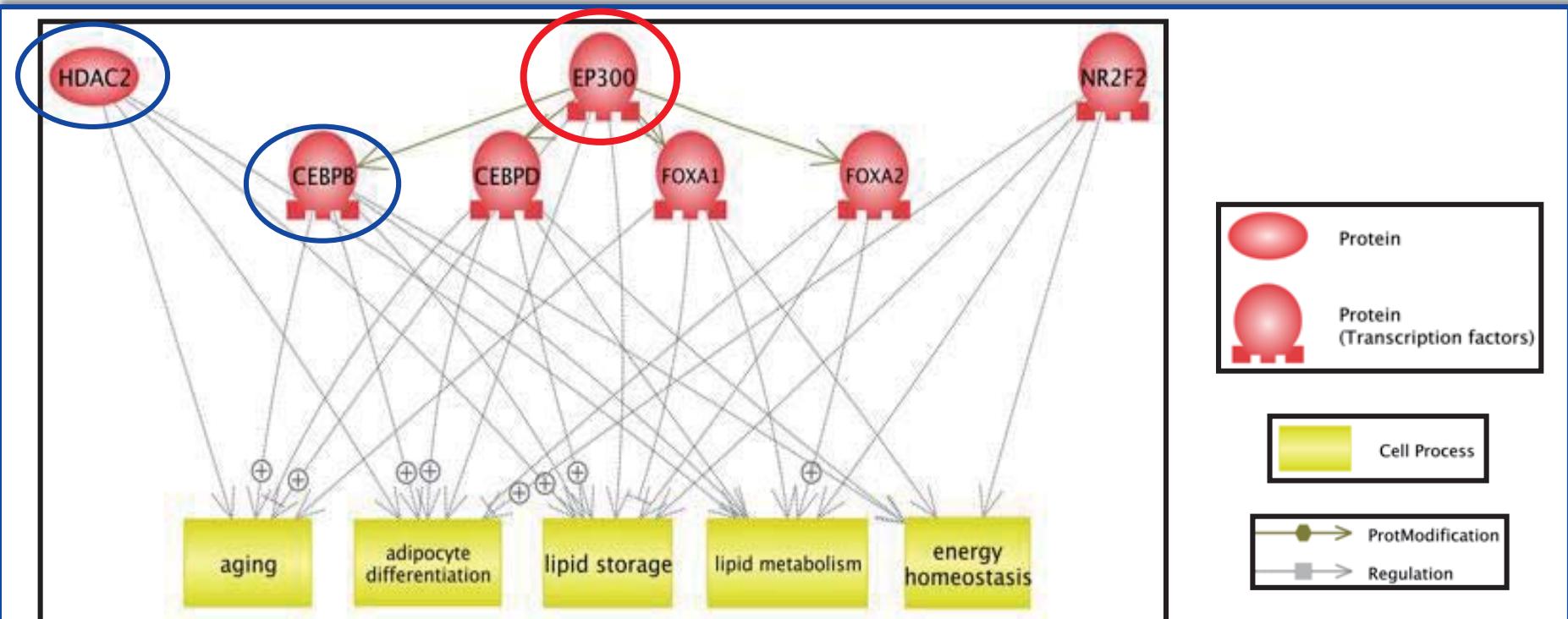
腹腔内脂肪



【結果】① EP300 の阻害剤 (C646) 処理にて  
内臓脂肪量は減少  
② t-RES 処理にて内臓脂肪量が減少



# *t*-RES の内臓脂肪蓄積抑制のメカニズム



( EP300 : ヒストンアセチル基転移酵素でもある制御転写因子、HDAC2 : ヒストン脱アセチル化酵素、C/EBP $\beta$  : 热產生能制御転写因子)

## *t*-RES の内臓脂肪蓄積抑制のメカニズム

: 肥満に伴う脂肪細胞での *EP300* の活性増加と *HDAC2* の活性低下によるヒストン (DNAを束ねるタンパク質) のアセチル化亢進が標的遺伝子の転写を異常化させるが、*t*-RES は、このヒストンアセチル化亢進を抑制し、*EP300* と *HDAC2* の標的遺伝子の転写を正常化させることで、内臓脂肪の蓄積が抑制されることが示唆。

# まとめ

ヒト肥満モデルにおいて、*t*-RESの

- i) 血液中の中性脂肪と内臓脂肪の減少効果
  - ii) 肥満の脂肪組織において活性化される *EP300* (遺伝子の発現制御因子) の抑制効果 ⇔ *EP300* の阻害は内臓脂肪量を減少
- *t*-RES はカロリー制限と共に転写制御ネットワーク、特に肥満に伴い脂肪細胞で活性化する *EP300* (転写制御因子、ヒストンアセチル基転移酵素) を制御し、その活性上昇を正常化することで、内臓脂肪の蓄積抑制と減少につながることが示唆が明らかとなり、心疾患のリスクに関連する内臓脂肪の蓄積（肥満）抑制の機序に *t*-RES が関与していることが強く示唆された。
- \* 肥満の脂肪細胞において、*EP300* が肥満治療のターゲットとなる可能性が示唆