

令和 3 年 4 月 17 日現在

機関番号：34419

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K05541

研究課題名(和文) 魚類由来エラスチンペプチド摂取による腎血管保護作用の解明

研究課題名(英文) An evaluation of the protective effects of elastin peptide obtained from fish  
bulbus arteriosus in renal arteries

研究代表者

竹森 久美子 (Takemori, Kumiko)

近畿大学・農学部・准教授

研究者番号：00288888

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：我々は魚類由来エラスチンペプチドが白血球と内皮細胞の接着抑制を介して高血圧性腎血管障害を抑制することを明らかにした。Dipeptidyl Peptidase-IV (DPP-IV)はインクレチンの分解の他、炎症部位に好発現することが知られている。そこで、エラスチンペプチドがDPP-IV阻害活性を有無を確認したところ低分子のエラスチンペプチドが強いDPP-IV阻害活性を有することを確認した。今後は、DPP-4阻害剤投与とエラスチンペプチド摂取による血管傷害抑制効果の差異を明らかにし、高血圧性血管障害と糖代謝異常発症抑制効果を有する機能性食品成分としてのエラスチンペプチドの有用性を明らかにする。

研究成果の学術的意義や社会的意義

慢性腎臓病は高血圧や糖尿病が原因で引き起こされる国民病として知られています。その予防・発症遅延のため我々は日々の食生活から取り入れられる食品由来成分として、魚類由来エラスチンペプチドが体中の炎症を抑え、これらの疾患にかかりにくく、病気になるのを遅らせる作用を持つ可能性が見いだされました。今後は、一般の人が入手しやすいサプリメントや健康食品素材としての供給を増やしていきたいと考えております。

研究成果の概要(英文)： In this study, we revealed that fish-derived elastin peptides prevent the occurrence of hypertensive renal vascular dysfunctions, which mediated by suppressing adhesion between leukocytes and endothelial cells.

Dipeptidyl peptidase IV (DPP-IV) is known to be expressed at the site of inflammatory lesions, as well as have the degrading action of incretin. We confirmed that the low molecule elastin peptides have DPP-IV inhibition activity. In the future, we will clarify the usefulness of elastin peptide as a functional food with protective effect against the onset of hypertensive and diabetic vascular injuries.

研究分野：実験病理学

キーワード：エラスチン 高血圧 SHRSP 腎血管障害

## 1. 研究開始当初の背景

慢性腎臓病発症とその進行には、生活習慣病が強く関与しており、その背景には、血管の形態的・機能的障害が存在する。動脈硬化症では、病変部において弾性線維の分解により生成されるエラスチンペプチドが炎症性細胞の走化性を惹起することにより、病変の進展に関与していることが報告されている。一方、我々は重症の高血圧モデルである脳卒中易発症性ラット (SHRSP) に魚類由来エラスチンペプチドを経口摂取させたところ、予想に反して、大動脈内皮細胞障害や腎動脈血管壊死が抑制されることを形態学的に確認した。これらの結果は内因性エラスチンとは異なり、外因性エラスチンペプチドが動脈における炎症反応抑制に作用することを示している。

## 2. 研究の目的

本研究では、魚類動脈球エラスチンペプチド摂取による血管炎に基づく動脈病変の発症抑制効果を検証するとともに、慢性腎臓病の発症を抑制し得る機能的ペプチドとしての有効性を明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

(1) エラスチンペプチド慢性投与による腎血管障害抑制の形態学的評価を実施した。生後 10 ~ 12 週齢で成熟し、かつ血圧 200 mmHg に達した SHRSP に、カツオエラスチンペプチド (林兼産業 : 600 mg/kg/day) を 1 日 2 回に分け 4 週間強制経口投与した。実験期間終了後、麻酔下で採血・脱血後、両腎臓を摘出し腎臓の病理組織学的検索として血管壊死および糸球体病変を HE 染色標本と比較するとともに、Masson trichrome 染色標本で、腎線維化領域を比較した。

(2) 抗炎症ならびに白血球活性化抑制作用を示すペプチドの血中移行を確認するため、SHRSP の血液から Ficoll を用いて白血球を単離し、エラスチンペプチド含有血漿でコートしたチャンバースライドに白血球を播種した。その後 Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA)、lipopolysaccharide (LPS) で白血球を刺激し、接着能を比較した。

(3) 更に好中球活性化因子同定のため、ANCA, TNF, IL-6, NATs の血中濃度について WKY と SHRSP の加齢に伴う変化を比較した。

(4) エラスチン特有の性質である熱コアセルベートが生じる精製エラスチンの供給源として、我々はマグロ動脈球に着目した。化学的分解手法に基づき (Pardridge (1963) ら) 可溶化エラスチン精製手技の安定化を目指し条件設定を実施した。

## 4. 研究成果

(1) 生後 12 週齢の雄性 SHRSP にエラスチンペプチド (EP : 林兼産業) を 600mg/kg/day となるように、朝夕に 1 日 2 回経口投与を (Elastin 群) 4 週間実施した。ラットにエラスチンペプチドを摂取させると Proryl Glycine (PG) が最も多量に血中に移行することを確認した。EP 摂取による降圧効果は認められなかったが、典型的な高血圧性血管病変である腎臓の細小動脈における血管壊死の頻度は Control 群に比べ Elastin 群で有意に低値であり、腎臓の線維化も抑制されていた。さらに腎糸球体を含む微小血管内皮細胞における ICAM-1 の発現は有意に低く、正常血圧の WKY と同程度の値を示した。

(2) また、生後 20 週齢の SHRSP から採血し、多核型白血球画分 (PMN) を得た。生後 10 週齢の雄性 SD ラットに EP を 1 g/kg 経口摂取させ、30 分後に採血して得られた EP 分解産物を含む plasma を、チャンバースライドにコートした (EP coat)。処理したチャンバ-

スライドに PMN を添加し、ペプチド非摂取ラット plasma coat 処理 (Cont coat) と細胞接着数を比較したところ、EP coat では Cont coat に比べて白血球の接着が明らかに少数であった。以上の結果より魚類由来エラスチンペプチドは、白血球と内皮細胞の接着抑制を介して高血圧性腎血管障害を抑制する作用を有することが示唆された。

(3) 好中球活性化因子の同定のため、ANCA、TNF、IL-6、NATs の血中濃度について WKY と SHRSP の加齢に伴う変化を比較したが、DPP-IV はインクレチンの分解の他、炎症部位に好発現することが知られている。予備実験で、エラスチンペプチドが DPPIV 阻害活性を有することを確認したことから、平均分子量の異なる近大マグロ動脈球由来  $\alpha$  エラスチン (m.w: 60000 ~ 84000)、 $\beta$  エラスチン (m.w: 5500)、カツオエラスチン (林兼産業: m.w: 1000 以下) を用い、DPP-IV 阻害活性の有無と阻害強度について比較検討した。いずれのエラスチンペプチドサンプルでパンクレアチン処理後も DPP-IV 阻害活性が確認できたが、希釈により阻害活性は低下した。パンクレアチン未処理のサンプル間では、カツオエラスチンペプチドの阻害活性が最も高値であった。こちらも希釈すると阻害活性は段階的に低下するものの、近大マグロ  $\alpha$  および  $\beta$  エラスチンペプチドと比べ、カツオエラスチンの阻害活性は高く維持されていた。また、SHRSP は加齢にともない糖代謝異常を発症するが、このラットにエラスチンペプチド添加糖負荷試験を実施したところ、インスリン分泌促進をともなう血糖値上昇抑制が確認された。以上のことから、SHRSP における好中球活性化因子として DPP-IV が関与する可能性が示された。予備実験では Ficoll 単離した白血球画分に DPP-IV が発現することを realtime PCR で確認していることから、今後は免疫染色により白血球表面における DPP-IV タンパク質発現の同定を試みる。

(4) エラスチンペプチドの新規の供給源として近大マグロ動脈球アルカリ処理に条件設定が不十分で、精製度・収率の向上には至らなかった。また、熱コアセルベートによる  $\alpha$  および  $\beta$  エラスチンの分離を試みたが、アミノ酸分析の結果、 $\beta$  エラスチン画分に  $\alpha$  エラスチンの混在が認められ、熱コアセルベートを用いて  $\alpha$  エラスチンの精製は可能であるが、 $\beta$  エラスチンの精製には限界があることが示された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 0件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 竹森 久美子	4. 巻 12
2. 論文標題 2. Digital Hypertension - 最先端医療の今 - 魚類由来エラスチンペプチド摂取による腎血管保護作用 .	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 メディカル・サイエンス・ダイジェスト	6. 最初と最後の頁 34-37
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 竹森久美子
2. 発表標題 魚類由来エラスチンペプチドの組織傷害抑制作用：新規機能性ペプチドとしての有用性
3. 学会等名 第51回日本結合組織学会学術大会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 竹森 久美子、山中 重明、米谷 俊
2. 発表標題 高血圧性腎血管傷害に対するエラスチンペプチドの抑制効果(優秀演題賞受賞)
3. 学会等名 第16回日本機能性食品医学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 竹森 久美子、赤星 保光、米谷 俊
2. 発表標題 高血圧性動脈病変に対するエラスチンペプチドの抑制効果
3. 学会等名 第8回国際病態生理学会（国際学会）
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------