

血管異常収縮の発症機構と  
桑葉由来成分による予防機序に関する研究

Analysis of the triggering mechanism of vascular abnormal contraction  
and its preventive mechanism by mulberry leaves

鶴留 奈津子

2023 年

## Abstract

Vascular diseases such as cardiovascular and cerebrovascular diseases are directly related to blood vessels and account for fatal diseases around the world. Their causes can be classified into three categories: vascular abnormal contraction, arteriosclerosis, and hemorrhage. Vascular abnormal contraction has afflicted many people for years without any treatment or preventive methods. Sphingosylphosphorylcholine (SPC) is a causative factor, but its mechanism still remains unknown, making it difficult to establish treatment and preventive methods. However, prevention by food has attracted considerable attention in recent years. It has been reported that vegetables and fruits have various physiological functions. Mulberry (*Morus australis* Poir.) is known to have some physiological effects, but no studies on abnormal contraction have been conducted. Therefore, this study confirmed their preventive effect against SPC-induced vascular abnormal contraction and identified their active compounds and mechanisms.

The preventive effect against SPC-induced abnormal contraction was evaluated using cell imaging of cultured human coronary artery smooth muscle cells (HCASMCs). Mulberry leaves were classified by their ages or processing method, their preventive effect was verified by co-culturing HCASMCs with their extract, and it was found that mulberry leaves over 20-years-old trees were effective. In addition, the active compound was identified as fisetin, which is more abundant in mulberry leaves than in strawberries and apples, and their hydroxyl group at the C-3 was considered the active site through structure-activity relationships.

To reveal the preventive mechanism of fisetin and the pathogenesis of SPC, the mechanism around the plasma membrane, which is upstream of the reaction field in the vicinity of the cell, were the focus of attention. Consequently, through molecular interaction analysis, fisetin was found to act directly on HCASMCs and not inhibit SPC activity. It was also confirmed that nitrobenzoxadiazole-SPC, the fluorescent-labeled SPC, is incorporated into cells via endocytosis and that exocytosis is occurring specifically in abnormally contracted cells. However, such occurrences were also observed in fisetin-treated cells. Therefore, it was concluded that these phenomena are not related to the preventive mechanism of fisetin but to the pathogenesis of SPC-induced vascular abnormal contraction.

## Abbreviation

1-Deoxynojirimycin; 1-DNJ

4',6-Diamidino-2-phenylindole, dihydrochloride; DAPI

Bovine serum albumin; BSA

Caveolin1; Cav1

Control; Ctrl

Dimethyl sulfoxide; DMSO

Endothelin 1; ET-1

Flotillin1; Flot1

Flow cytometry; FCM

Fluorescein isothiocyanate isomer; FITC

Forward scatter; FSC

Fyn tyrosine kinase; Fyn

Heteronuclear multiple bond correlation; HMBC

Heteronuclear single quantum correlation; HSQC

High-performance liquid chromatography-ultra violet; HPLC-UV

Human coronary artery smooth muscle cells; HCASMCs

Liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry; LC-ESI-MS/MS

Myosin light chain; MLC

Nitrobenzoxadiazole; NBD

Not detected; N.D.

Nuclear magnetic resonance; NMR

Peroxisome proliferator-activated receptor; PPAR

Porcine aortic endothelial cells; PAECs

Proteinase activated receptor; PAR

Rho kinase; ROCK

Sodium dodecyl sulfate; SDS

Side scatter; SSC

Sphingomyelin; SM

Sphingosine-1-phosphate; S1P

Sphingosylphosphorylcholine; SPC

Standard deviation; S.D.

Surface plasmon resonance; SPR

Trifluoroacetic acid; TFA

Tris-buffered saline-Tween 20; TBS-T

p-Nitrophenyl  $\alpha$ -D-Glucopyranoside; p- $\alpha$ -NPG

p-Nitrophenyl  $\beta$ -D-Glucopyranoside; p- $\beta$ -NPG

Methyl-beta-cyclodextrin; M $\beta$ CD

$\gamma$ -aminobutyric acid; GABA

## 目次

第一章 序論	7
第二章 血管異常収縮を予防可能な桑葉由来成分の探索	11
2.1. 緒論	11
2.2. 実験方法	11
2.2.1. 材料	11
2.2.2. 桑試料抽出物の調製	11
2.2.3. 細胞培養	12
2.2.4. 血管異常収縮予防効果	12
2.2.5. 桑葉抽出物の分画	13
2.2.6. 活性成分の同定及び定量	13
2.2.7. 配糖体の含有確認	14
2.2.8. 血管内皮細胞膜透過性試験	15
2.2.9. 統計処理	15
2.3. 結果	16
2.3.1. 桑試料による血管異常収縮予防効果	16
2.3.2. Mulberry leaves(>20-year-old trees)に含まれる活性成分の分画・精製	18
2.3.3. Mulberry leaves(>20-year-old trees)に含まれる活性成分の同定	19
2.3.4. 桑試料に含まれる Fisetin 含有量	22
2.3.5. 血管異常収縮を予防する Fisetin の至適濃度	24
2.3.6. 血管異常収縮を予防する Fisetin の至適共培養時間	25
2.3.7. Fisetin の血管内皮細胞層透過性	27
2.3.8. Fisetin 関連化合物による構造活性相関	27
2.3.9. Mulberry leaves(>20-year-old trees)に含まれる Fisetin 関連化合物の定量	29
2.4. 考察	30
第三章 血管異常収縮の発症機構と桑葉由来成分による予防機序の解析	35
3.1. 緒論	35
3.2. 実験方法	35
3.2.1. 細胞培養	35
3.2.2. フローサイトメトリー (Flow cytometry; FCM)	36

3.2.3.	表面プラズモン共鳴法 (Surface plasmon resonance; SPR)	36
3.2.4.	共培養細胞における Fisetin 含有量測定	36
3.2.5.	ライブセルイメージング	37
3.2.6.	ウエスタンブロッティング	37
3.2.7.	エクソソームの単離と検出	38
3.2.8.	統計処理	38
3.3.	結果	38
3.3.1.	Fisetin と HCASMCs の相互作用	38
3.3.2.	SPC による異常収縮への細胞膜上マイクロドメインの関与	40
3.3.3.	SPC の局在解析	42
3.3.4.	SPC の細胞内移行へのエンドサイトーシスの関与	43
3.3.5.	SPC による異常収縮へのエキソサイトーシスの関与	45
3.4.	考察	46
<b>第四章</b>	<b>総括</b>	<b>52</b>
	<b>謝辞</b>	<b>55</b>
	<b>参考文献</b>	<b>56</b>

## 第一章 序論

心筋梗塞や脳梗塞、肺高血圧症など血管が直接関係する心疾患や脳血管疾患は、長年、世界の死因の多くを占めてきた[1,2]。その原因は、動脈硬化、血管攣縮、出血や炎症の3つに大きく分類される。特に血管攣縮は発症機構に未解明な点が多く、老若男女問わず誰もがあつる日突然発症するリスクを抱えている[3,4]。

血管は、通常、収縮と弛緩を繰り返し血圧や血流を一定に保つが、血管攣縮を引き起こすと局所的に血管が狭窄し虚血を生じる。血管は内側から内膜、中膜、外膜の三層で構成されているが (Fig. 1-1)、血管攣縮は中膜を構成する血管平滑筋細胞 (Smooth muscle cells) の過剰な収縮である異常収縮により発生する。そのため、血管攣縮を予防するには血管平滑筋細胞での異常収縮の発生を抑制する必要がある。

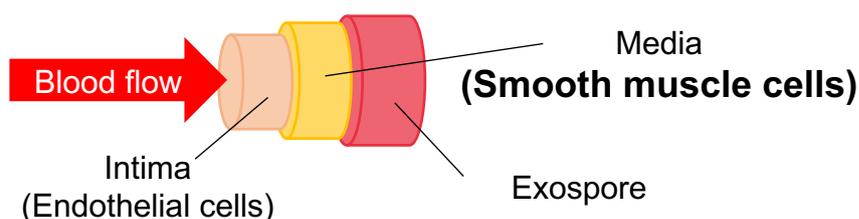


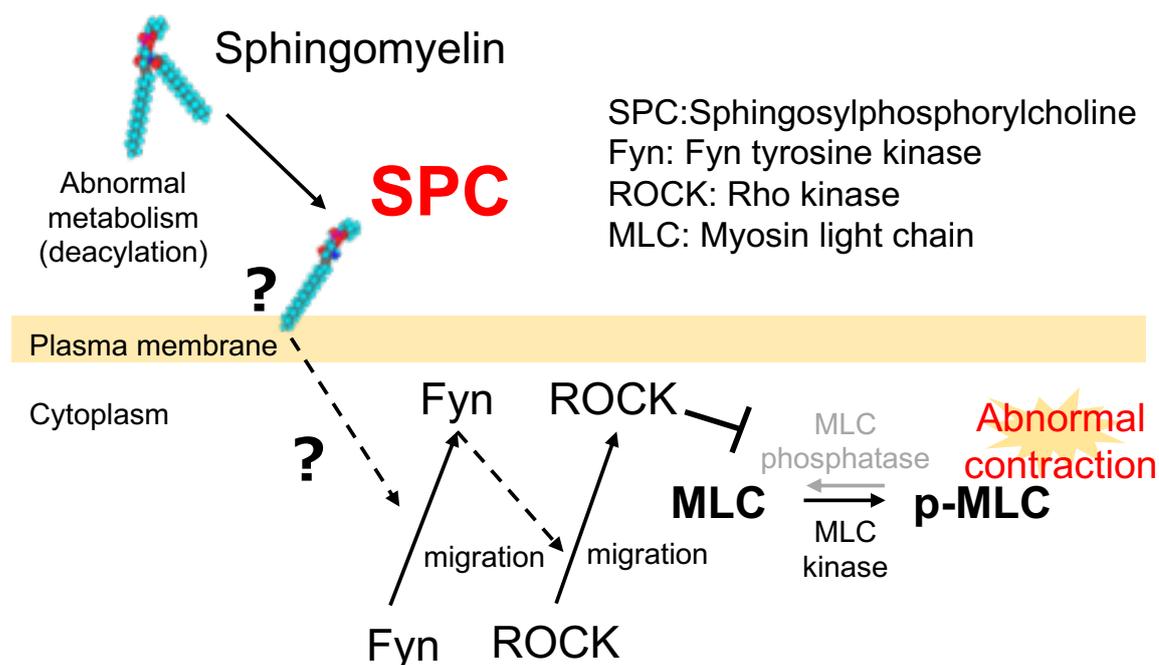
Figure 1-1 Blood vessel structure

血管攣縮は、くも膜下出血後に生じること[5-7]や、手足の冷えやリュウマチの原因となるレイノー現象を引き起こすこと[7]が知られている。血管攣縮の原因分子は、Sphingosylphosphorylcholine (SPC)[9-11]や Thrombin[12]、Pyridostigmine[13]、Endothelin 1 (ET-1) [14]などが報告されている。Thrombin による血管攣縮は、血管内膜を構成する血管内皮細胞に通常発現しているプロテイナーゼ活性化型受容体 (Proteinase activated receptor; PAR) が動脈硬化などの血管損傷により血管平滑筋細胞に発現し、血管平滑筋細胞膜上の PAR に Thrombin が作用することで異常収縮が発生する[12]。Pyridostigmine はコリン作動薬であり、医薬品の服用による副作用で血管攣縮を引き起こす。しかし SPC や ET-1 は生理活性物質であるため、血管損傷や医薬品の服用によらず、誰もが血管攣縮を発症するリスクを抱えている[15,16]。近

年、ET-1による血管攣縮に対しては治療薬が開発され[14]、対処方法があるが、SPCによる血管攣縮に対しては対症療法すらない。また重篤な血管攣縮の場合、血流が滞るため、例えば救命されても重大な後遺症が残る場合が多い。そこで、治療法の開発では手遅れになることもあると考え、事前に血管攣縮の発症を抑制する予防法確立を目指して本研究では研究を進めることにした。

血管平滑筋細胞は、通常、 $\text{Ca}^{2+}$ 依存性の収縮と弛緩を繰り返し血流や血圧を一定に保っている。しかし異常収縮を起こした細胞では、 $\text{Ca}^{2+}$ 濃度によらず一度収縮すると二度と弛緩しない[17-19]。SPCは、様々な細胞膜を構成する Sphingomyelin (SM)の代謝異常により脱アシ化され生じる[20]。また SPC が作用した血管平滑筋細胞では、細胞内の Fyn チロシンキナーゼ (Fyn tyrosine kinase; Fyn) や Rho キナーゼ (Rho kinase; ROCK) が細胞膜周辺に移行することが知られ[10]、最終的に Rho キナーゼの活性化によりミオシン軽鎖 (Myosin light chain; MLC) ホスファターゼが阻害されることで弛緩反応が起こらなくなり、収縮反応が過剰となり異常収縮が発生するとされている (Fig. 1-2)。しかし、SPCによる異常収縮のシグナル伝達の起点となる血管平滑筋細胞膜上での SPC の作用部位が未解明なため、SPCによる異常収縮の発症機序の解明を困難とし治療法や予防法の確立を妨げてきた。これまでの研究で、高脂血症や高血圧、肥満、喫煙歴を持つ狭心症や大腸癌患者における内胸動脈や胃下垂動脈、結腸動脈における血管組織コレステロール量や血清コレステロール量と SPC による異常収縮の発生頻度に相関性が報告されている[21]。そのため血管平滑筋細胞膜上における SPC の作用部位としては、SPC と構造が類似した Sphingosine-1-phosphate (S1P)の受容体である S1P 受容体や細胞膜上タンパク質などの関与も考えられるが、コレステロールと SPC による異常収縮の密接な関係性から、細胞膜上でコレステロールが集中した領域である細胞膜上マイクロドメインの関与が示唆されてきた。しかし SPC による異常収縮において、コレステロールによる血管平滑筋細胞への直接的作用は明らかでなく、血管組織にコレステロールが作用することにより産生される代謝産物等の関与も考えられる。そのため、本研究では SPC の作用部位の一つとして細胞膜上マイクロドメインの関与を明らかにすることを目

指した。



**Figure 1-2 The mechanism of sphingosylphosphorylcholine (SPC)-induced contraction in vascular smooth muscle cells**

一方、近年、Nutraceuticals と呼ばれる食品由来成分による疾病予防が注目を集めている。日常的に食事を介して摂取可能な食品由来成分は、医薬品と同等の機能性を持つものも多く、誰でも気軽に摂取可能なことから疾病の予防法として注目を集めている[22-24]。食品由来成分は一度に摂取できる量が限られており、現在、従来の食経験から安全性試験は必要とされていないが、医薬品は多量に摂取することが出来るため安全性試験が求められており、開発に多大な年月を要し実用化までの道のりが長い。そのため現段階では、食品由来成分は医薬品に比べ法規制が少なく食品由来成分による疾病予防は手軽に取り組みやすいとされ注目を集めているが、天然物に含まれる機能性成分の含有量のばらつきや大量摂取による副作用などから規制が求められており、欧州連合等ではその検討が進められている[25,26]。しかし適切に活用すれば食品由来成分による疾患予防は実現可能であるため、大きな期待が寄せられている。特に、異常収縮による血管疾患は、最悪の場合、加療前に死に至ることもあり、日常的な予防法が求められていることから、食品由来成分による予防法確立が期待される。

異常収縮が発生する血管平滑筋細胞は、活性酸素により炎症[27]や石灰化[28]など様々な血管疾患を誘発することが知られている。そのため、抗酸化物質が血管機能の保持に有効であると考えられてきた[29,30]。そこで本研究では、抗酸化物質が血管異常収縮を抑制可能であると仮説を立て、様々な抗酸化物質が報告されているが[31,32]、血管異常収縮についての生理活性については未解明な桑に着目した。桑は、イラクサ目クワ科クワ属に分類される落葉高木で山野に自生しており複数種報告されている[33]が、本研究では日本や東アジアに自生するヤマグワ (*Morus australis* Poir.) を使用した。ヤマグワは4月から6月に最盛期を迎え、日本では養蚕の飼料として栽培され、漢方薬などの伝統薬としても活用されてきた[34-37]。桑は、抗炎症効果[38,39]や血糖値抑制効果[37]、血管内皮機能改善[40,41]など様々な生理機能が報告されており、特に血管への機能的作用について示唆されている[42]が、血管異常収縮に対する生理活性については未解明である。また以前の研究で、魚油などに含まれる Eicosapentaenoic acid[43]や Docosapentaenoic acid[44]による SPC 誘発性異常収縮に対する抑制効果は報告されているが、そのほかの食品由来成分による異常収縮予防効果については報告がない。そこで本研究では、桑による血管異常収縮予防効果を明らかにし、その活性成分を同定することで予防機序の解明を目指し、血管異常収縮予防法の確立を目指した。

## 第二章 血管異常収縮を予防可能な桑葉由来成分の探索

### 2.1. 緒論

桑の代表的な機能性成分として、桑の葉に含まれ  $\alpha$ -グルコシダーゼ阻害活性を示す 1-Deoxynojirimycin (DNJ)がある[45,46]。しかし、その他の機能性成分や生理機能については未解明な点が多い。桑は、前臨床試験や臨床試験で 1-DNJ やポリフェノール類などの機能性成分による高血糖抑制効果や高血圧抑制効果、抗酸化活性など様々な生理的機能が報告されており[42]、血管異常収縮に対する機能性が期待されるが、その詳細な制御機能については明らかでない。そこで本研究では桑による血管異常収縮予防効果を明らかにするため、桑を部位や加工方法、樹齢により細分化し、異常収縮の発生を抑制する予防効果を評価することで活性成分の同定を目指した。

### 2.2. 実験方法

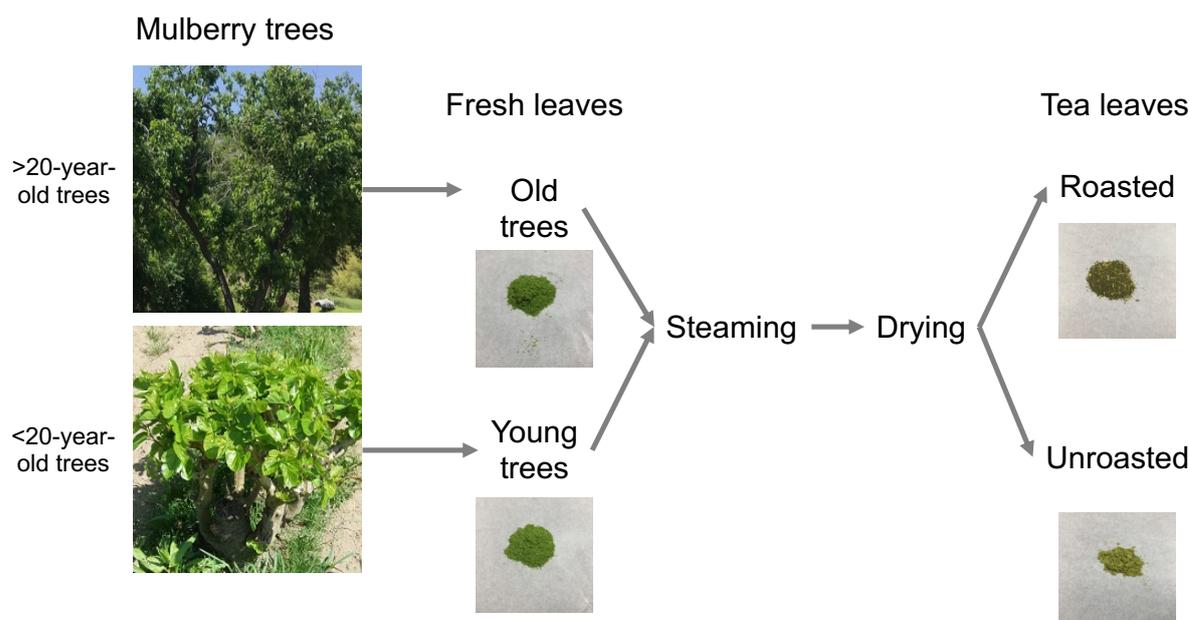
#### 2.2.1. 材料

桑試料は宮園製茶(鹿児島県薩摩川内市)より入手した。ヒト冠動脈平滑筋細胞(HCASMCs)や HuMedia-SB2、HuMedia-SG2、HuMedia-EG2 は倉敷紡績株式会社から購入した。Porcine aortic endothelial cells (PAECs)はコスモ・バイオ株式会社から購入し、SPC や Fluo3-AM はシグマアルドリッチジャパン合同会社より購入した。核磁気共鳴法(Nuclear magnetic resonance; NMR)に使用した Dimethyl sulfoxide (DMSO)- $d_6$  (0.03% tetramethylsilane)は ACROS ORGANICS より購入し、Fisetin は東京化成工業株式会社より購入した。

#### 2.2.2. 桑試料抽出物の調製

Mulberry leaves は樹齢による影響を考慮し、Mulberry leaves(>20-year-old trees)と Mulberry leaves(<20-year-old trees)に分類した。Tea leaves は焙煎処理による影響を考慮するため、Flesh leaves を樹齢によらず混合し、30 秒間蒸気処理後、80 °C で 50 分間乾燥し、焙煎処理を施し

たものを Tealeaves(Roasted)、焙煎処理を施していないものを Tea leaves(Unroasted)とした (Fig. 2-1)。また、果実は凍結乾燥したものを用いた。いずれの試料も粉末化し 30 mg/mL になるよう 70%エタノールを添加後、攪拌及び超音波処理 (4 °C、10 分間) を行い、遠心分離 (4 °C、698×g、10 分間) し上清を回収した。これを 2 回繰り返す、回収した上清を濃縮乾固後、使用するまで -20 °C で保管した。



**Figure 2-1 Processing method of mulberry tea leaves.**

### 2.2.3. 細胞培養

HCASMCs を HuMedia-SG2 を用いて、37 °C、CO<sub>2</sub> 濃度 5%に設定したインキュベーター (PHC 株式会社) で培養した。HCASMCs は継代回数が 8 回以内のものを使用した。PAECs も同様に HuMedia-EG2 を用いて培養し、継代回数が 8 回以内のものを使用した。

### 2.2.4. 血管異常収縮予防効果

24well プレートに HCASMCs を  $2.0 \times 10^4$  cells/well 播種し、HuMedia-SG2 で約 24 時間培養後、目的濃度に調製した評価試料を添加し約 72 時間培養した。細胞密度が 80-90%コンフルエントに到達したことを顕微鏡観察で確認後、上清を除去した。細胞質を染色するため最終濃度が 3 μM になるように Fluo3-AM を添加後、37 °C、CO<sub>2</sub> 濃度 5%に設定したインキュベーター

ターで1時間反応させた。続いて同量の2 mM CaCl<sub>2</sub> (最終濃度 1 mM) を添加し、同様に30分間反応させた。反応終了後、上清を除去し、目的濃度に調製した評価試料を添加した後、37°C、CO<sub>2</sub>濃度5%に設定したインキュベーターで30分間反応させ、様々な条件でのSPC刺激による細胞形態観察を行った。SPC刺激は30 μMもしくは100 μM SPCで行い、異常収縮誘発前後の細胞形態を培養顕微鏡 CKX-53 (オリンパス株式会社) で観察し、ImageJ ver1.52 (National Institutes of Health)で細胞表面積を算出した。なお本測定系では対照群は桑試料未処理細胞とし、SPCによる異常収縮予防効果を評価した。

#### 2.2.5. 桑葉抽出物の分画

濃縮乾固した桑葉抽出物を超純水で超音波処理により完全に溶解後、カットオフ 5000 のPD-10 (Cytiva) を用いたゲルろ過クロマトグラフィーで Fraction 1~6 に分画し、濃縮乾固後、2.2.4.に従い異常収縮予防効果を評価した。Fraction 1~6 のうち活性の高かった画分を逆相クロマトグラフィーに供し、細分画した。逆相クロマトグラフィーは、C18 逆相カラム (TSKgel ODS-100Z、5 μm、4.6 mm ID、15 cm ; 東ソー株式会社) を用いた高速液体クロマトグラフィー LC-2000Plus series (日本分光株式会社) で、流速 1.0 mL/min、カラム温度 40°C、検出波長 UV 320 nm で分取した。分画には、(A) 0.1% トリフルオロ酢酸 (Trifluoroacetic acid; TFA) 及び (B) アセトニトリルを用い、以下のグラジエントで溶出した。0~10 min : A 液 10%を維持、10~20 min : B 液を 100%まで上昇、20~30 min : B 液 100%を維持。10分毎に Fraction X~Z に分画し、2.2.4.に従い各画分の異常収縮予防効果を確認した。

#### 2.2.6. 活性成分の同定及び定量

##### Liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry (LC-ESI-MS/MS)

Fraction X~Z のうち活性の高かった画分を QTRAP 3200 system (株式会社エービー・サイエックス) 付き LC20 HPLC system (株式会社島津製作所) による LC-ESI-MS/MS で分析した。LC 分析には、C18 逆相カラム (TSKgel ODS-100Z、5 μm、4.6 mm ID、15 cm) を用い、溶出溶媒には蒸留水及びアセトニトリルを使用し、流速 0.4 mL/min、注入量 10 μL で10分間アイ

ソクラティック溶出した。MS/MS 分析は、Positive ion mode と Negative ion mode の両方で検出を試み、最終的に Positive ion mode で検出した。他の測定条件に関しては以下の通りである。

スキャンタイプ：Enhanced product ion、Curtain gas：20、Ionspray voltage：5500、Temperature：500 °C、Ion source gas 1：40、Ion source gas 2：50、Collision energy：35。得られたフラグメントは MS/MS スペクトルデータベース METLIN (The Scripps Research Institute) を用いて解析した。

### NMR spectroscopy

LC-ESI-MS/MS による活性成分探索の結果、候補物質として考えられた化合物の分子量を有するピークを分取し、NMR 700 MHz 装置 (ブルカージャパン株式会社) を用いた <sup>1</sup>H NMR 及び <sup>13</sup>C NMR による 1 次元 NMR と Heteronuclear single quantum correlation (HSQC) 及び Heteronuclear multiple bond correlation (HMBC) による 2 次元 NMR を株式会社カネカに測定依頼した。

### High-performance liquid chromatography-ultra violet (HPLC-UV)

活性成分の定量は EXTREMA (日本分光株式会社) を用いて行った。C18 逆相カラム (TSK gel ODS-100Z、5 μm、4.6 mm I.D.、25 cm) を用い、UV 検出器を 320 nm に設定し、溶出溶媒には 0.1% TFA 及びメタノールを使用した。測定は、流速 1.0 mL/min、注入量 10 μL、カラム温度 40 °C で 12 分間アイソクラティック溶出した。なお、関連化合物の定量についても本法を用いた。

#### 2.2.7. 配糖体の含有確認

2.2.2.にて調製した Mulberry leaves(>20-year-old trees)抽出物を 20 mg/mL になるように超純水で溶解した (20 mg/mL Mulberry leaves(>20-year-old trees)抽出液)。また陽性対照としてニトロフェノールにグルコースがグリコシド結合した 20 mM *p*-Nitrophenyl α-D-Glucopyranoside (*p*-α-NPG) 及び 20 mM *p*-Nitrophenyl β-D-Glucopyranoside (*p*-β-NPG) (富士フイルム和光純薬工業株式会社) を用いた。各試料 25 μL を pH5.0 の 0.1 M 酢酸緩衝液 50 μL と混合し、37 °C に設

定したインキュベーターで 5 分間プレインキュベートした。0.00022~0.22 U/mL の  $\alpha$ -glucosidase 及び  $\beta$ -glucosidase (ナカライテスク株式会社) を 25  $\mu$ L ずつ添加し、37 °C に設定したインキュベーターで 20 分間反応後、0.2 M  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  を 100  $\mu$ L 添加し反応を終了させ、メタノールを 200  $\mu$ L 添加しフィルターろ過後、2.2.6.と同様に HPLC-UV で活性成分を検出した。また酵素分解においては、活性成分が損傷を受けないか確認するため DMSO で溶解した活性成分を使用して確認した。

#### 2.2.8. 血管内皮細胞膜透過性試験

30 倍希釈した Cellmatrix Type I-A (新田ゼラチン株式会社) で Intercell TP (倉敷紡績株式会社) をコーティング後、PAECs を  $2.0 \times 10^5$  cells/well ずつ播種した。37 °C、 $\text{CO}_2$  濃度 5% に設定したインキュベーターで約 24 時間培養後、フェノールレッドを含まない HuMedia-EB2 に置換した。37 °C、 $\text{CO}_2$  濃度 5% に設定したインキュベーターで約 12 時間培養後、評価試料と共に最終濃度が 50  $\mu$ M になるように調製した Fluorescein isothiocyanate isomer (FITC)-dextran (シグマアルドリッチジャパン合同会社) を添加し、37 °C、 $\text{CO}_2$  濃度 5% に設定したインキュベーターで反応させ、反応 1、6、12、84 時間後の外室液を全量回収した。回収した外室液は Infinite F NaNo+ spectrofluorometer (TECAN) で蛍光強度 (Ex. 485 nm、Em. 535 nm) を測定した。反応終了後、内室液を全量回収し、外出液の残余と共に凍結乾燥機で濃縮乾固した。さらにインターセル内部にメタノールを添加後、ピペッティングで細胞を溶解させ全量を回収し細胞溶解液とした。細胞溶解液は、濃縮遠心機で濃縮乾固した。これら濃縮乾固物に含まれる活性成分を 2.2.6.と同様に HPLC-UV で定量し、添加量に対する検出量の割合を算出した。

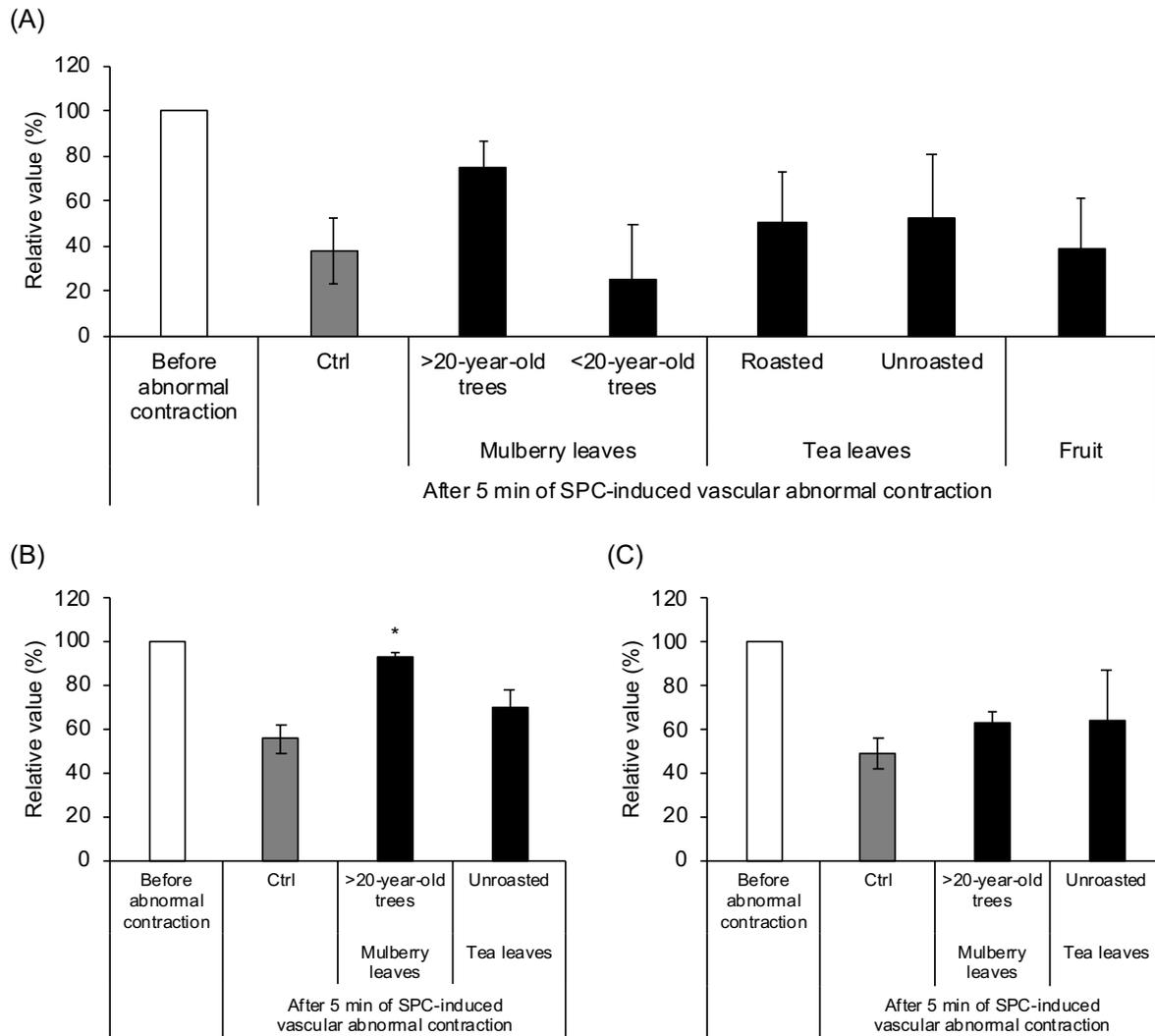
#### 2.2.9. 統計処理

全ての統計解析は、Microsoft Office Excel 2019 を使用して行った。データ解析は、Tukey-Kramer 法による多重比較検定を行った。

## 2.3. 結果

### 2.3.1. 桑試料による血管異常収縮予防効果

樹齢や加工方法により細分化した桑試料 (Fig. 2-1) を異常収縮誘発 30 分前に曝露し、桑試料存在下で SPC 刺激による異常収縮を誘発した結果、桑試料を曝露していない対照群 (Control; Ctrl) では異常収縮誘発前の細胞表面積に対する相対値が 37.6 まで減少した。これに対し、Mulberry leaves(>20-year-old trees)や Tea leaves(Unroasted)は、それぞれ 75.2 及び 69.4 であった (Fig. 2-2A)。次に、これら桑試料との共培養時間や異常収縮誘発時の桑試料の存在が異常収縮予防効果に与える影響について検討した。その結果、共培養時間を 30 分から 60 時間に延長しても Mulberry leaves(>20-year-old trees)や Tea leaves(Unroasted)による異常収縮予防効果に変化はなかった (Fig. 2-2B)。しかし、同様に共培養 60 時間後、桑試料を含まない培地に置換し、桑試料非存在下で異常収縮を誘発すると、その予防効果が低下した (Fig. 2-2C)。

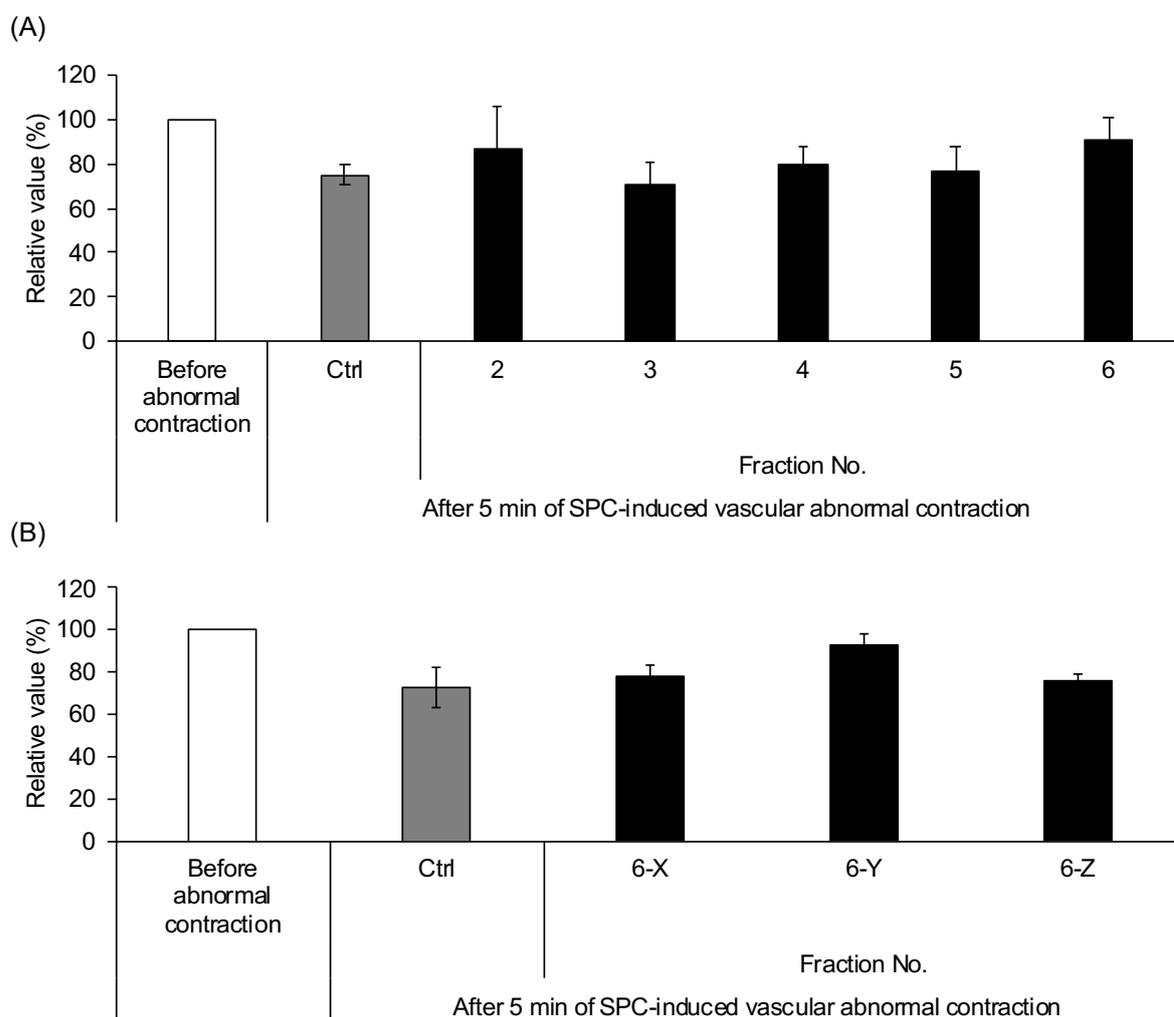


**Figure 2-2 Preventive effect of mulberry extracts against sphingosylphosphorylcholine (SPC)-induced vascular abnormal contraction.**

Effects of the mulberry extract against SPC-induced vascular abnormal contraction after incubation for 30 min (A) and 60 h (B), and without mulberry extracts when the cells were stimulated by SPC after incubation for 60 h (C). Data are represented as mean  $\pm$  S.D. (n = 4); \*p < 0.05 vs. Ctrl (induction of abnormal contraction without the addition of mulberry extract)

### 2.3.2. Mulberry leaves(>20-year-old trees)に含まれる活性成分の分画・精製

最も異常収縮予防効果を示した Mulberry leaves(>20-year-old trees)に含まれる活性成分を探るため、ゲルろ過クロマトグラフィーにより分画した。Fraction 1 は分子量が大きく (5000 Da 以上) 経口摂取での吸収が困難であり、Fraction 2 は SPC 刺激によらず細胞形態異常が確認されたため除外した。その結果、Fraction 6 に異常収縮予防効果が高い傾向があった (Fig. 2-3A)。そのため HPLC を用いた逆相クロマトグラフィーにより、Fraction 6 をさらに Fraction 6-X、6-Y、6-Z に分画したところ、親水性と疎水性の両親媒性を示す Fraction 6-Y に異常収縮予防効果が高い傾向があることがわかった (Fig. 2-3B)。

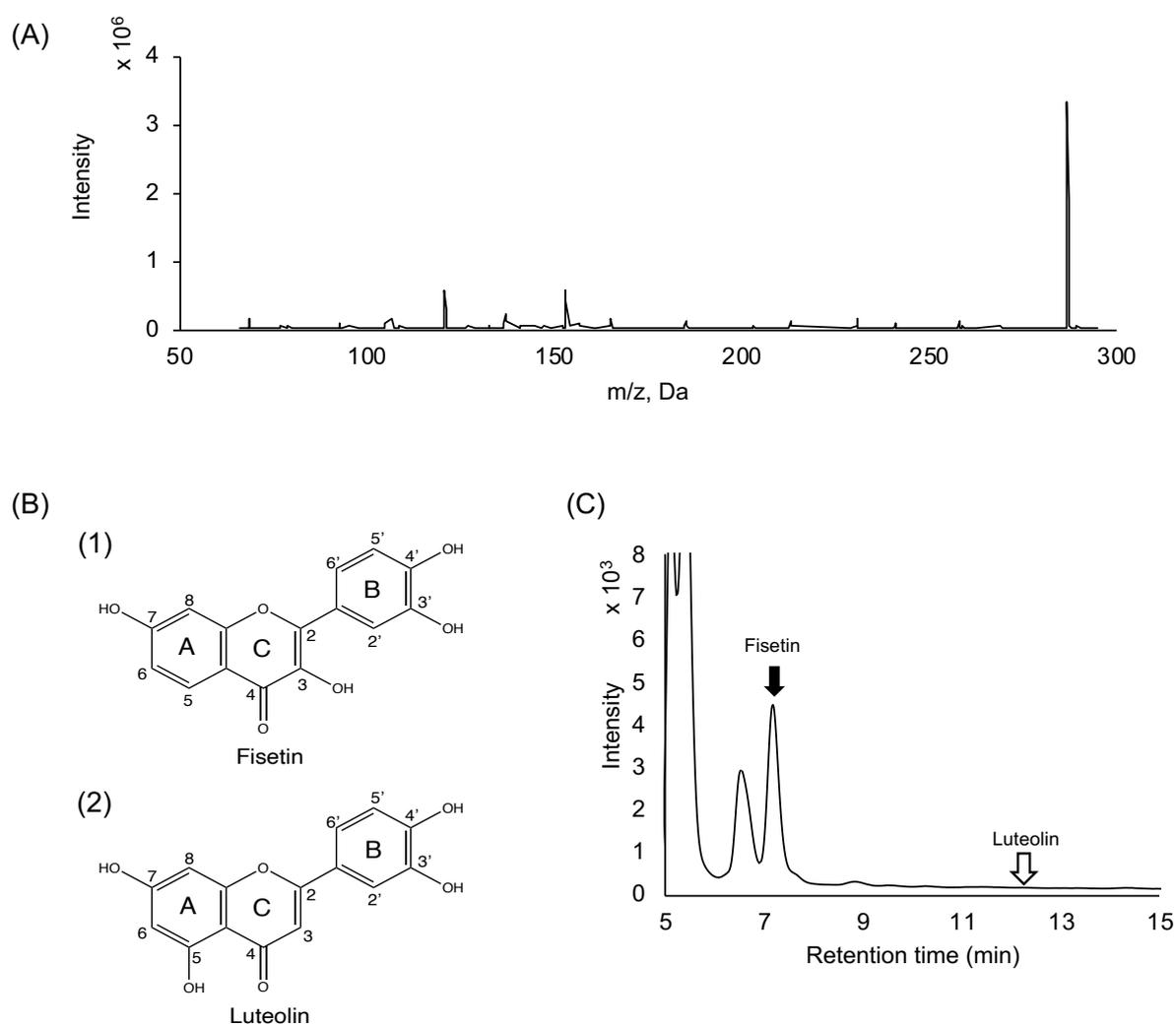


**Figure 2-3 Preventive effect of mulberry leaves from >20-year-old trees extract fractions against sphingosylphosphorylcholine (SPC)-induced vascular abnormal contraction.**

(A) Effect of gel filtration chromatography fractions 2-6. (B) Effect of reversed-phase HPLC fractions 6-X, 6-Y, and 6-Z. Data are represented as mean  $\pm$  S.D. (n = 3); \*p < 0.05 vs. Ctrl (induction of abnormal contraction without the addition of mulberry extract fractions)

### 2.3.3. Mulberry leaves(>20-year-old trees)に含まれる活性成分の同定

Mulberry leaves(>20-year-old trees)に含まれる異常収縮予防成分を同定するため、2.3.2.にて異常収縮予防効果が高い傾向にあった Fraction 6-Y を LC-ESI-MS/MS にて分析した (Fig. 2-4A)。その結果、 $m/z [M+H^+]$  286.8 の Fisetin (Fig. 2-4B.1) と Luteolin (Fig. 2-4B.2) が候補化合物として選出された。Fisetin はフラボノイド骨格の C 環 3 位、Luteolin は A 環 5 位に水酸基を有し、その他の構造は同一である。そのため Mulberry leaves(>20-year-old trees)に含まれる Fisetin と Luteolin を定性したところ、Fisetin は含まれていたが、Luteolin は含まれていなかった (Fig. 2-4C)。



**Figure 2-4 Search for the candidate compound of mulberry leaves from >20-year-old trees that prevent sphingosylphosphorylcholine (SPC)-induced vascular abnormal contraction.**

(A) LC-ESI-MS/MS spectrum of fraction 6-Y. (B) Structural formula of fisetin (1) and luteolin (2). (C) Chromatogram of mulberry leaves from >20-year-old trees.

しかし Fisetin と Luteolin は構造が類似しており、Retention time のみでは確定不可能であると  
考えられたため、NMR により候補化合物の化学構造を解析した。その結果、<sup>1</sup>H NMR より、  
A 環 5 位のスペクトラムが同じカップリング定数を持つ化学シフトの二重線であり、A 環 5  
位に H が配位していることが示唆された (Table 1、Fig. 2-5A 及び B)。さらに、2~3 結合離  
れた C-H 結合情報を得るため HMBC により解析したところ、以下のようになった (Fig. 2-  
5C)。H-5 ( $\delta_{\text{H}}$  7.91–7.92)に対する C の結合情報は、C-4 (171.81)、C-7 (162.20)、C-8 (101.67)、  
C-9 (156.14)。H-6 ( $\delta_{\text{H}}$  6.90)に対する C の結合情報は、C-4、C-5 (126.32)、C-7、C-8、C-9。H-8  
( $\delta_{\text{H}}$  6.87–6.90)に対する C の結合情報は、C-6 (114.55)、C-7、C-9、C-10 (114.02)。H-2' ( $\delta_{\text{H}}$  7.68–  
7.69)に対する C の結合情報は、C-1' (122.33)、C-3' (144.86)、C-4' (147.10)、C-2 (144.89)。H-5'  
( $\delta_{\text{H}}$  6.87–6.89)に対する C の結合情報は、C-1'、C-2' (114.77)、C-3'、C-4'、C-6' (119.47)。H-6'  
( $\delta_{\text{H}}$  7.53–7.54)に対する C の結合情報は、C-3'、C-4'、C-5' (115.42)。さらに隣り合う C-H 結合  
情報を得るため HSQC により解析したところ、以下のようになった (Fig. 2-5D)。H-5 proton  
( $\delta_{\text{H}}$  7.91–7.92) には C-5 ( $\delta_{\text{C}}$  126.32)が結合し、H-6 ( $\delta_{\text{H}}$  6.90)には C-6 ( $\delta_{\text{C}}$  114.55)、H-8 ( $\delta_{\text{H}}$  6.87–  
6.90)には C-8 ( $\delta_{\text{C}}$  101.67)、H-2' ( $\delta_{\text{H}}$  7.68–7.69)には C-2' ( $\delta_{\text{C}}$  114.77)、H-5' ( $\delta_{\text{H}}$  6.87–6.89) には C-  
5' ( $\delta_{\text{C}}$  115.42)、H-6' ( $\delta_{\text{H}}$  7.53–7.54)には C-6' ( $\delta_{\text{C}}$  119.47)が結合していた。これより 5 位の C-H 結  
合で相関シグナルが得られたため、A 環 5 位に H が直接結合していることが明らかとなった。  
そのため Mulberry leaves(>20-year-old trees)に含まれる異常収縮予防成分は Fisetin であること  
が同定された。



**Table 1**  
Nuclear magnetic resonance data for fisetin.

Position	Mulberry leaves (>20-year-old trees)	
	<sup>13</sup> C NMR (ppm)	<sup>1</sup> H NMR (ppm), $\delta$ , <i>J</i> (Hz)
2	144.9	
3	137	
4	171.8	
5	126.3	7.92, <i>dd</i> , <i>J</i> =7.0
6	114.6	6.90, <i>m</i>
7	162.2	
8	101.7	6.90, <i>m</i>
9	156.1	
10	114	
1'	122.3	
2'	114.8	7.69, <i>d</i> , <i>J</i> =7.0
3'	144.9	
4'	147.1	
5'	115.4	6.89, <i>m</i>
6'	119.47	7.54, <i>dd</i> , <i>J</i> =7.0

#### 2.3.4. 桑試料に含まれる Fisetin 含有量

桑試料に含まれる Fisetin 含有量を定量したところ、Mulberry leaves(>20-year-old trees)は 283.61  $\mu\text{g/g}$  乾燥粉末であったが、Mulberry leaves(<20-year-old trees)は 606.21  $\mu\text{g/g}$  乾燥粉末で最も多く Fisetin が含まれていた (Table 2)。Fisetin はイチゴ (160.0  $\mu\text{g/g}$  青果物) やリンゴ (26.9  $\mu\text{g/g}$  青果物) に多く含まれ、桑に含有されることは報告されていないが[47]、桑試料の方が高値であった。またフラボノイド類は、通常、配糖体として植物中に存在するため、酸加水分解と酵素分解による配糖体の切断検討の結果、 $\beta$ -glucosidase による酵素分解を行った。しかし、酵素分解を行っても Mulberry leaves(>20-year-old trees)に含まれる Fisetin 量に変化はなかった (Fig. 2-6)。なお、Fisetin 配糖体の酵素処理においては、アグリコンを同様に酵素処理することで Fisetin 自身が損傷を受けないことを確認した。

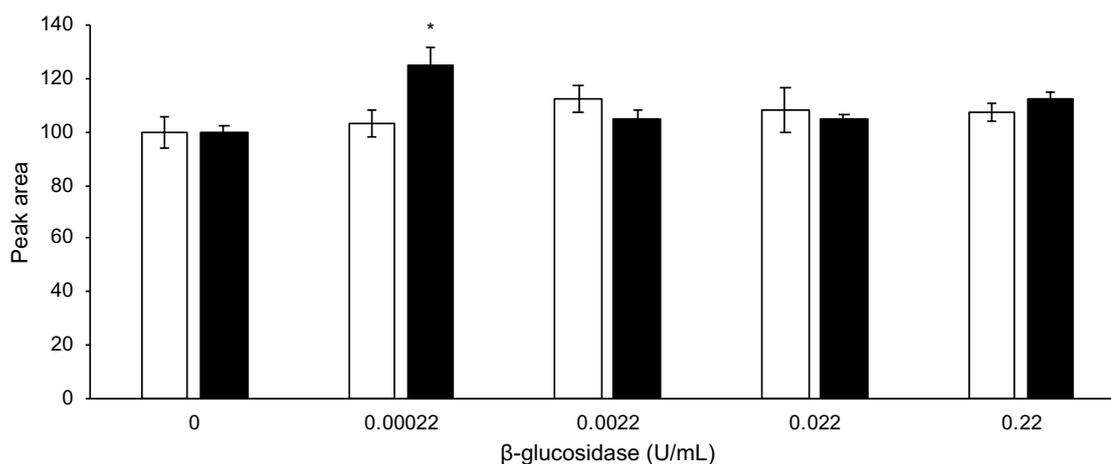
**Table 2**

Quantitative analysis of fisetin in different parts of mulberry, strawberry, and apples.

Sample name			Fisetin ( $\mu\text{g/g}$ dry wt.)		
			Mean	S.D.	
Mulberry	Leaves	>20-year-old trees	283.61	1.97	–
		<20-year-old trees	606.21	9.26	*
	Tea leaves	Roasted	153.67	1.92	*
		Unroasted	175.81	2.26	*
	Fruit	12.49	3.70	*	
Strawberry	Fruit	0.02	0.01	*	
	Leaves	N.D.	–	–	
Apple	Fruit	N.D.	–	–	
	Peel	N.D.	–	–	

Note: \* $p < 0.05$  vs. >20 year-old-trees

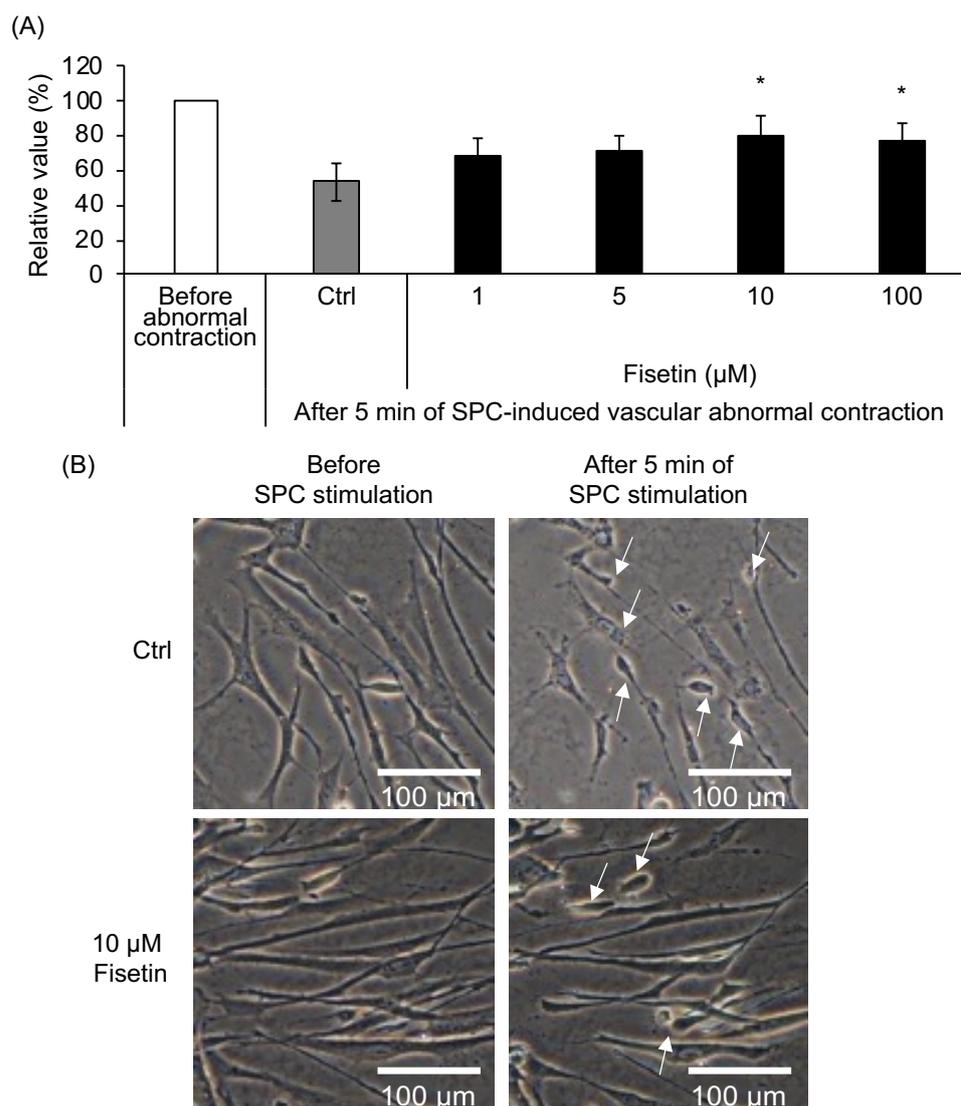
Abbreviations: N.D., not detected; S.D., standard deviation.

**Figure 2-6 Enzymatic digestion of the glycoside in mulberry leaves from >20-year-old trees.**

The peak area of fisetin using HPLC-UV. Black and white indicate the peak area of fisetin standard and the extracts of mulberry leaves (>20-year-old trees). \* $p < 0.05$  vs. 0 U/mL  $\beta$ -glucosidase treatment. Data are represented as mean  $\pm$  S.D.

### 2.3.5. 血管異常収縮を予防する Fisetin の至適濃度

SPC による異常収縮を予防する Fisetin の至適濃度を検討した結果、Fisetin は 1  $\mu\text{M}$  以上で異常収縮を予防する傾向があることを明らかにした (Fig. 2-7A)。Fisetin 未処理細胞では異常収縮誘発 5 分後に細胞形態異常や収縮が見られたのに対して、最も異常収縮予防効果を示した 10  $\mu\text{M}$  Fisetin 処理群は、異常収縮誘発前においても細胞形態異常は見られず、SPC 刺激 5 分後における収縮細胞は、Fisetin 未処理群と比較して少なかった (Fig. 2-7B)。

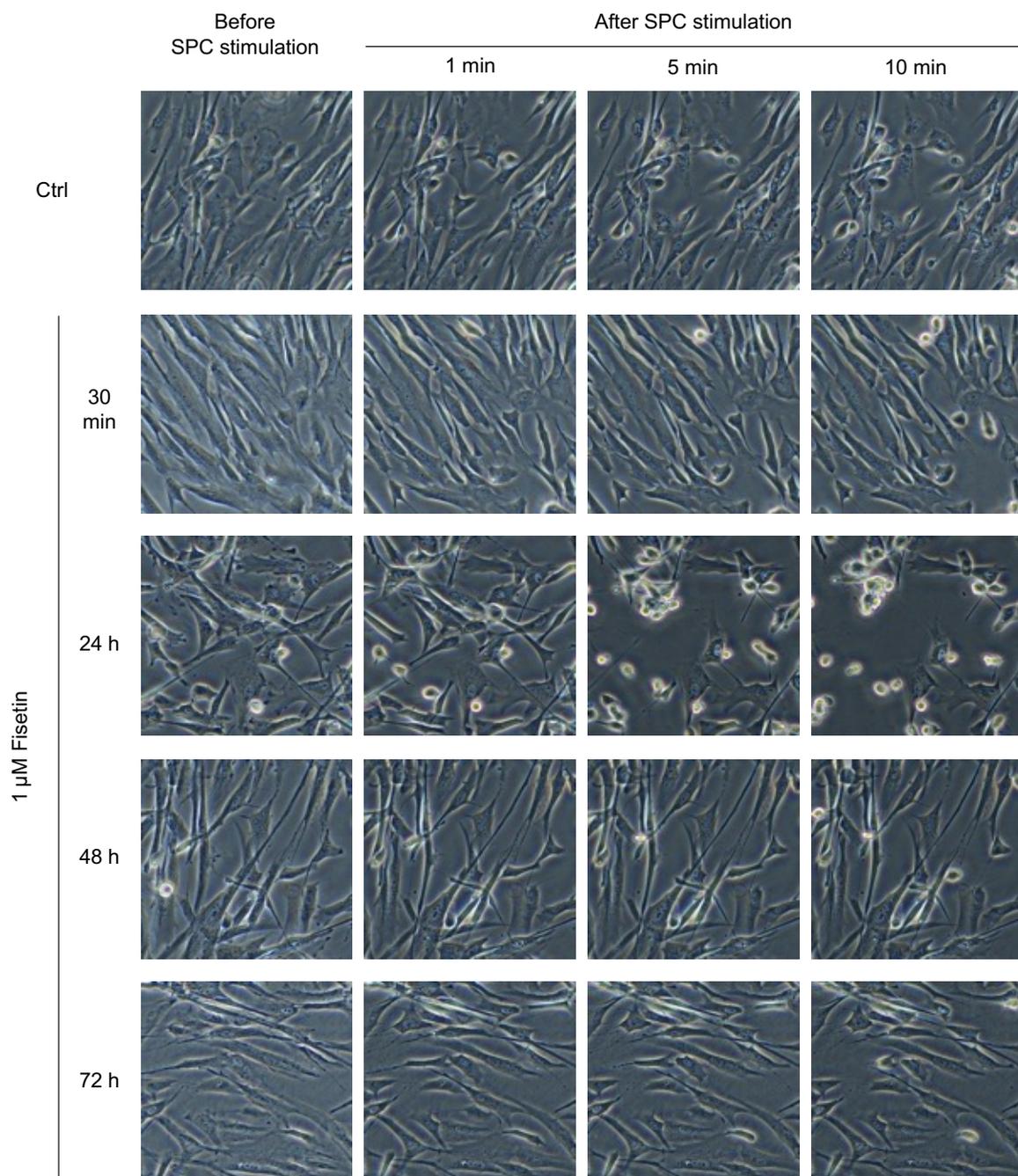


**Figure 2-7 Optimal concentration of fisetin to prevent sphingosylphosphorylcholine (SPC)-induced vascular abnormal contraction.**

(A) Effects of fisetin against sphingosylphosphorylcholine (SPC)-induced vascular abnormal contraction. \* $p < 0.05$  vs. Ctrl (induction of abnormal contraction without the addition of fisetin). Data are represented as mean  $\pm$  S.D. (B) Images of the preventive effect of fisetin against SPC-induced vascular abnormal contraction of human coronary artery smooth muscle cells. Arrows indicate the abnormally contracted cells.

### 2.3.6. 血管異常収縮を予防する Fisetin の至適共培養時間

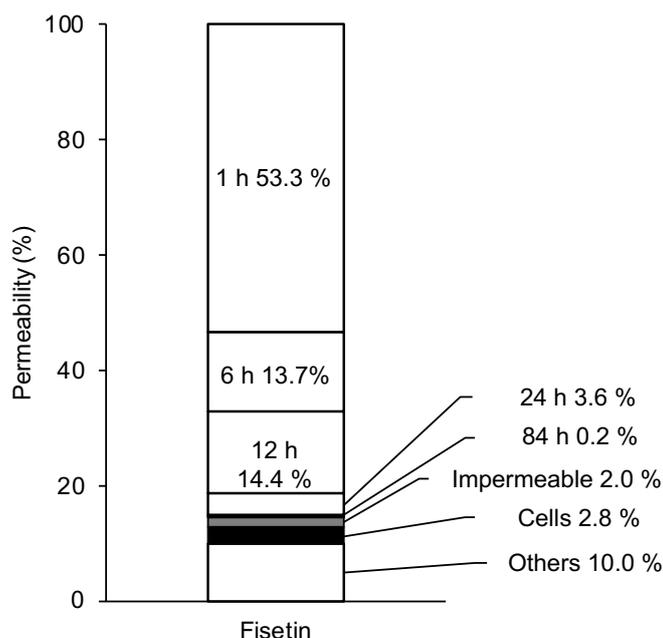
2.3.1.にて、桑試料との共培養時間や SPC 刺激時に桑試料が共在していることが異常収縮予防効果に影響を与えることが明らかとなったため、Fisetin と血管平滑筋細胞の共培養時間が血管異常収縮予防効果へ与える影響を 2.3.1.と同様の方法で検討した。2.3.5.にて、Fisetin は 1  $\mu\text{M}$  以上で異常収縮予防効果を示す傾向があったため、1  $\mu\text{M}$  Fisetin による異常収縮予防効果を評価した。その結果、Fisetin は 48 時間以上共培養すると異常収縮予防効果を示すことを明らかにした (Fig. 2-8)。一方、血清を含まない基礎培地に切り替える際に Fisetin を添加した共培養 24 時間の評価群では、SPC 刺激を施していない時点で細胞の形態がくさび形になる形態異常が見られ、さらに SPC 刺激すると Fisetin による予防効果が示されなかった。



**Figure 2-8 Effect of fisetin against sphingosylphosphorylcholine (SPC)-induced vascular abnormal contraction at various co-culture times.**

### 2.3.7. Fisetin の血管内皮細胞層透過性

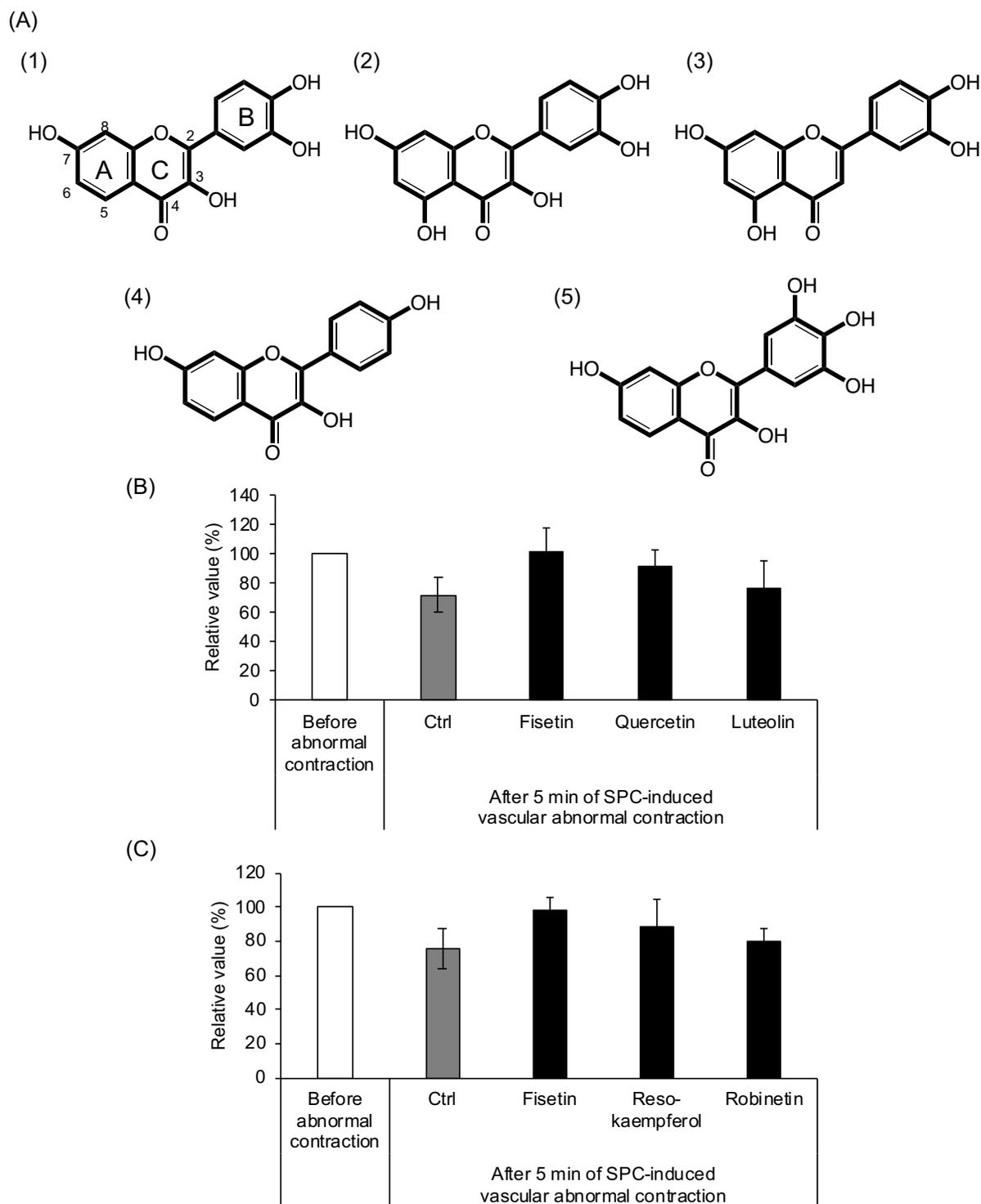
異常収縮が発生する血管平滑筋細胞に Fisetin が直接作用するには、血管内膜を構成する血管内皮細胞を透過する必要がある。そこで、Fisetin の血管内皮細胞層透過性を評価したところ、1 時間で全体の 53.3%、84 時間までに 85.2%が内皮細胞を透過し、Fisetin が血管平滑筋細胞に直接作用可能なことを明らかにした (Fig. 2-9)。



**Figure 2-9 Vascular endothelial cell permeability of fisetin.**

### 2.3.8. Fisetin 関連化合物による構造活性相関

Fisetin の活性部位を同定するため、Fisetin と類似した化学構造を有するフラボノイド類を用いて構造活性相関を評価した。Fisetin (Fig. 2-10A.1) と同様に A 環 7 位と B 環 3 位及び 4 位に水酸基を有し、A 環と C 環の水酸基の数や配置が異なる Quercetin (Fig. 2-10A.2) と Luteolin (Fig. 2-10A.3) を用いて、A 環及び C 環の水酸基の配置が異常収縮予防効果へ与える影響を評価したところ、Fisetin が最も予防効果が高く、次いで Quercetin、Luteolin の順である傾向があった (Fig. 2-10B)。次に、B 環の水酸基の数が異常収縮予防効果に与える影響を明らかにするため、A 環と C 環の水酸基の数や配置が Fisetin と同一で B 環の水酸基の数のみが異なる Resokaempferol (Fig. 2-10A.4) と Robinetin (Fig. 2-10A.5) を評価したところ、Fisetin、Resokaempferol、Robinetin の順に異常収縮予防効果を示す傾向があった (Fig. 2-10C)。

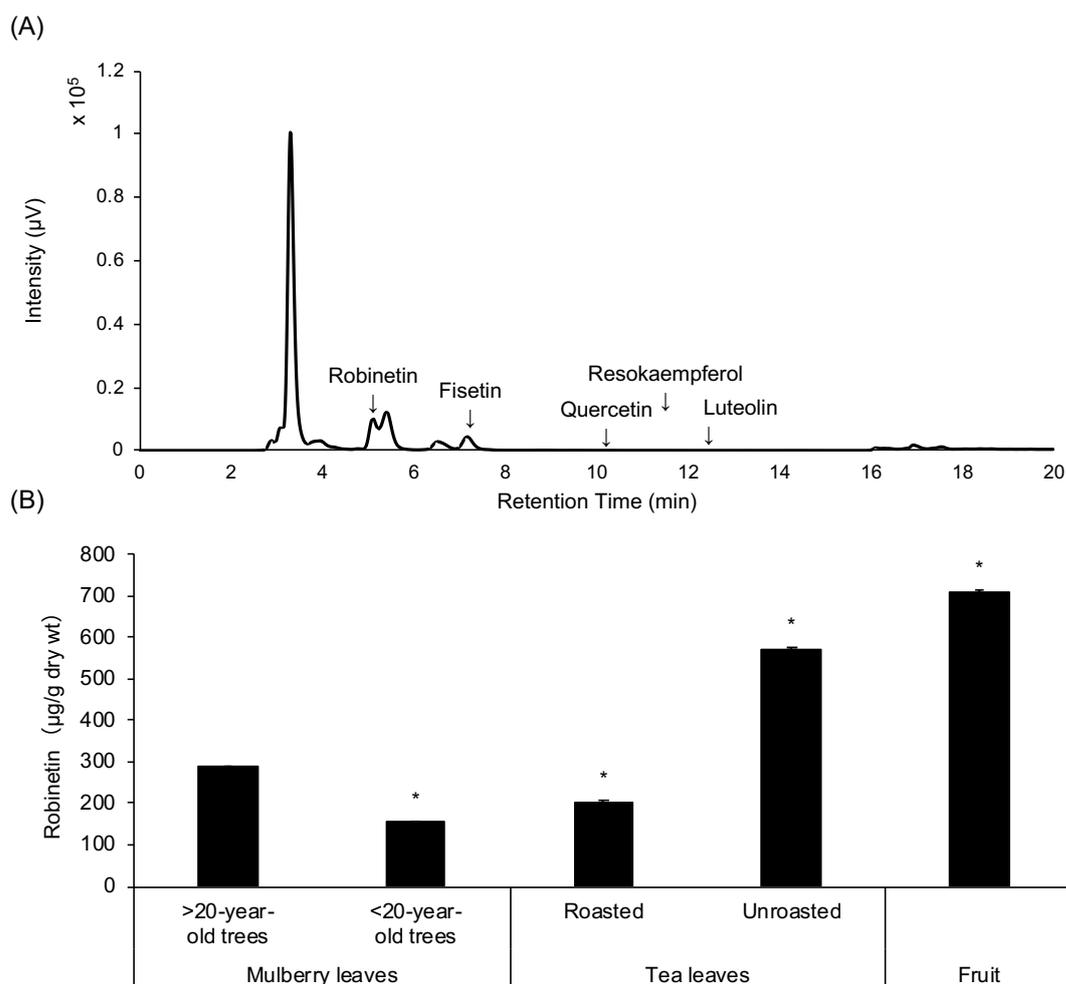


**Figure 2-10 Fisetin structure-activity relationship.**

(A) Chemical structures of the compounds to determine the structure-activity of fisetin. Fisetin (1), quercetin (2), luteolin (3), resokaempferol (4), robinetin (5). (B) Preventive effects of the hydroxyl group arrangement on the A-ring and C-ring against SPC-induced vascular abnormal contraction. Fisetin: hydroxyl group at the C-3 position, quercetin: hydroxyl group at the C-3 and the A-5 positions, luteolin: hydroxyl group at the A-5 position. (C) Preventive effects of the number of B-ring hydroxyl groups against SPC-induced vascular abnormal contraction. Fisetin: 2 hydroxyl groups, resokaempferol: 1 hydroxyl group, robinetin: 3 hydroxyl groups. Data are represented as mean  $\pm$  S.D. ( $n = 4$ ); \* $p < 0.05$  vs. Ctrl (induction of abnormal contraction without the addition of samples)

### 2.3.9. Mulberry leaves(>20-year-old trees)に含まれる Fisetin 関連化合物の定量

2.3.8より、Fisetin と構造が類似した関連化合物も異常収縮予防効果を示す傾向があり、いずれも植物体内でカルコン合成酵素により生成される化合物であるため、それらの Mulberry leaves(>20-year-old trees)における含有量を 2.3.3.と同様の方法で HPLC-UV により定量した。その結果、Fisetin と Robinetin のみ含有が確認され (Fig. 2-11A)、Robinetin は Tea leaves(Unroasted)や Fruit に多かった (Fig. 2-11B)。Tea leaves においては、焙煎処理の有無によって Robinetin 含量が変化していることから、焙煎処理により Robinetin 自体の化学構造が影響を受ける可能性が考えられた。



**Figure 2-11 Quantitative analysis of similar structural compounds to fisetin**

(A) The retention time of the compounds similar to fisetin. (B) The content of robinetin. Data are represented as mean  $\pm$  S.D. ( $n = 4$ ); \* $p < 0.05$  vs. Mulberry leaves(>20-year-old trees)

## 2.4. 考察

本研究では桑試料による異常収縮予防効果を明らかにするため、桑試料を樹齢や加工方法により細分化し、異常収縮を予防する活性成分を探索した。桑試料は、Mulberry leaves(>20-year-old trees)が最も異常収縮予防効果を示す傾向にあった。また、Tea leaves においては焙煎処理の有無が異常収縮予防効果に影響を与える可能性が高いことを明らかにした。これは茶葉を加工する過程で行われる焙煎処理が異常収縮予防成分に影響していると考えられる。実際に、桑葉に含まれるイミノ糖である 1-DNJ[48]や桜島大根に含まれるトリゴネリン[49]が加熱処理により分解されることや、高温乾燥により桑葉の抗酸化活性が低下する[50]ことが報告されており、焙煎処理が Tea leaves に含まれる異常収縮予防成分に影響している可能性が考えられた。また桑試料との共培養時間を延長しても異常収縮予防効果に変化はなかったが、桑試料非存在下では異常収縮予防効果が減少した (Fig. 2-2)。そのため、桑試料により異常収縮を予防するには日常的に摂取し、血中濃度を維持する必要があると考えられた。一方、この傾向は Fisetin のみと共培養した細胞では異なり、Fisetin との共培養時間と異常収縮予防効果が比例する傾向があった (Fig. 2-8)。これは、桑試料には Fisetin 以外の化合物も含まれるため、その相乗効果により共培養時間が異常収縮予防効果に影響しなかった可能性があると考えられた。

次に異常収縮予防効果が最も高い傾向にあった Mulberry leaves(>20-year-old trees)に含まれる活性成分を同定するため、ゲルろ過クロマトグラフィーと逆相クロマトグラフィーを用いて分画・精製を行った。ゲルろ過クロマトグラフィーでは、分子量 5000 以下の画分にて異常収縮予防効果を示したため、候補化合物の分子量が 5000 未満であると推定された。さらに逆相クロマトグラフィーでは水相と有機溶媒相共在下で得られた画分が最も異常収縮予防効果を示したため、候補化合物が親水性と疎水性の両方の性質を持つことが考えられた。また活性画分 6-Y を LC-ESI-MS/MS により分析したところ分子量 286 の Fisetin と Luteolin が候補化合物と考えられた。Fisetin は、フラボノイド群に属し C 環 3 位に水酸基を持つフラボノールで、Luteolin は同様にフラボノイド群に属し A 環 5 位に水酸基を持つフラボンである (Fig. 2-

3B)。そのため、これらの含有確認を HPLC-UV にて行ったところ、Mulberry leaves(>20-year-old trees)には Fisetin が含まれ、Luteolin は含まれていないことが判明した。しかし、Fisetin と Luteolin は類似した構造を有するため、分子量 286 を示すピークを分取し NMR にて構造解析を行ったところ、<sup>1</sup>H NMR で A 環 5 位を示すスペクトラムが二重線で得られたことから、活性成分が Fisetin である可能性が高いと考えられた。そのため 2 次元 NMR により C と H の関係性を分析したところ、Fisetin が異常収縮予防成分であることを同定した。Fisetin は、SPC による異常収縮と同様に血管平滑筋細胞内の ROCK の活性化を介したフッ化ナトリウムによる血管収縮を阻害することが報告されている[51]が、SPC による異常収縮に対する作用は未解明で、また桑葉から Fisetin を単離した報告もなかった。そのため、本研究が桑葉由来 Fisetin による SPC 誘発性異常収縮に関する初めての報告である。一方、Fisetin と共に異常収縮予防成分の候補化合物と考えられた Luteolin は、桑葉に含有されていることが報告されており[52]、アルギナーゼ阻害による血管内皮機能改善効果は報告されている[53]が、Fisetin と同様に異常収縮予防効果については未解明であった。以上より Fisetin は異常収縮予防成分として有効であると考えられたが、Mulberry leaves(>20-year-old trees)が Fisetin を含む異常収縮を予防する食品として有用なのか検証するために、Fisetin 含量が多い天然物として既報のあるイチゴやリンゴ、桑葉の Fisetin 含有量を比較したところ、桑葉に Fisetin が多く含まれることを新たに見出した (Table 2)。しかし、異常収縮予防効果が最も高かった Mulberry leaves(>20-year-old trees)に比べ、Mulberry leaves(<20-year-old trees)の Fisetin 含有量が多かった。桑葉は樹齢によって抗酸化酵素の発現量が変化するとの報告がある[54]。そのため、抗酸化酵素と同様に植物内に含まれフラボノイド類を合成するカルコン合成酵素もその発現量に樹齢による影響を受けていると考えられ、Fisetin の合成量が減少したり Mulberry leaves(<20-year-old trees)に含まれるその他の成分が Fisetin による異常収縮予防効果を阻害したりしている可能性があると考えられた。現在、Fisetin をはじめとしたフラボノイド類を直接阻害する物質については報告がない。そのため、他の成分が Fisetin 自体を阻害している可能性も考えられるが、Fisetin の作用機序に競合的に、もしくは間接的に阻害することで異常収縮予防効果を減退させている

可能性が高いと考えられた。また、オレンジやマンゴーにおいては樹齢が高いほど、ポリフェノール類などの抗酸化物質が多いことが報告されている[55,56]。そのため、樹齢の違いにより桑に含まれる成分が異なる可能性は高いと考えられた。

Fisetin はフラボノイド類に属するが、フラボノイド類は一般的に植物には配糖体として含まれていることが多い[57,58]。そこで Mulberry leaves(>20-year-old trees)に含まれる Fisetin 配糖体を確認したが、Mulberry leaves(>20-year-old trees)の Fisetin はアグリコンとして含まれていることを確認した (Fig. 2-6)。フラボノイド類は、配糖体より親油性の高いアグリコンの方が吸収されやすいことが知られている[59,60]。そのため桑葉に含まれる Fisetin がアグリコンであることは、生体内で利用されやすいと考えられた。実際に生体内での Fisetin の血中濃度については、ヒトでの報告は無いもののラットでは単回投与で最大血中濃度  $C_{max}$  が 73.94  $\mu\text{g/mL}$  (約 258  $\mu\text{M}$ ) [61]であり、Mulberry leaves(>20-year-old trees)の凍結乾燥粉末には 283.61  $\mu\text{g/g dry wt.}$ 含まれることから、計算理論上、約 0.3 g の凍結乾燥粉末を摂取すればラットでの最高血中濃度に到達し、異常収縮予防効果を示す血中濃度を実現可能であると考えられた。しかし、これには生体内での吸収効率を考慮する必要があるため、今後、ヒトにおける生体利用性について更なる検討が必要である。また最高血中濃度到達時間  $T_{max}$  は短く測定不能であり、血中濃度のうち分布相の半減期を示す  $T_{1/2\alpha}$  が  $1.72 \pm 0.69 \text{ min}$ 、消失相の半減期を示す  $T_{1/2\beta}$  が  $11.29 \pm 2.43 \text{ min}$ [61]と Fisetin は半減期が短いことが課題と考えられた。しかし桑葉はどのような樹齢・加工方法であっても Fisetin を含有することを明らかにしたため、桑茶として常時飲用し、食事として生葉を摂取することで異常収縮を予防可能な血中濃度を維持し、異常収縮を予防する食品由来成分として有効であると考えられる。Fisetin は食品由来成分ではあるが、常時摂取が必要となると副作用も十分に考えられ、安全性への配慮が懸念される。そのため桑葉ではなく精製された Fisetin を摂取する場合は特に、Fisetin は食品由来成分ではあるが低分子医薬品と同等な基準での安全性試験の実施が必要であると考えられる。さらにアグリコンとして吸収された Fisetin は生体内での代謝機構によりグルクロン酸抱合や硫酸抱合などの抱合反応を受けるが、Fisetin をアグリコンとして摂取した場合の動物実験 (ラット) でア

グリコン、グルクロン酸抱合体、硫酸抱合体の  $C_{max}$  を比較すると、それぞれ 73.94  $\mu\text{g/mL}$ 、27.06  $\mu\text{g/mL}$ 、29.10  $\mu\text{g/mL}$  という報告がある[61]。そのため、アグリコンとして摂取した Fisetin は代謝により抱合体に変換される[62]が、血中においてはアグリコンとしての存在量が多く、異常収縮を予防するのに十分な血中濃度であるため、アグリコンとして Fisetin を摂取しても生体内での代謝機構による影響は受けにくいと考えられた。以上のことから、異常収縮を予防するために必要な Fisetin の摂取濃度や血中濃度については実現可能性があると考えられたが、血中に存在する Fisetin が平滑筋細胞に作用し、異常収縮を予防するまでに時間を要する可能性がある (Fig. 2-9)。そこで、Fisetin と平滑筋細胞との共培養時間を比較することで、異常収縮予防効果に与える影響について考慮した。その結果、Fisetin と血管平滑筋細胞との共培養時間が異常収縮予防効果に影響を与えることを明らかにしたが、培地を基礎培地に交換するタイミングで Fisetin を曝露する (共培養時間 24 時間) と、細胞形態異常と異常収縮予防効果が減退することを明らかにした (Fig. 2-8)。フラボノイド類は生体内で血中アルブミンと複合体を形成し、全身に運搬されることが報告されている[63]。また Fatal bovine serum や Bovine serum albumin (BSA) などは Epigallocatechin gallate と複合体を形成することで細胞内 Reactive oxygen species 産生を減少させ、細胞死を阻止することが報告されている[64]。そのため血清非存在下で Fisetin を曝露すると、血清による細胞保護効果の減退や平滑筋細胞への Fisetin の運搬に影響を及ぼし、細胞形態異常や異常収縮予防効果を阻害したと考えられた。しかし、同様の条件で異常収縮誘発 30 分前に Fisetin を曝露すると形態異常や予防効果の減少が見られなかったことから、血清非存在下で Fisetin と長時間培養するとこれらの影響がもたらされると考えられた (Fig. 2-8)。生体内では常に血清成分が存在しているため、血清非存在下で発生するこれら現象の影響は考え難く *in vitro* のみでの現象であると考えられるが、平滑筋細胞への Fisetin の運搬機構を解明するために更なる追求が必要であると考えられる。

次に生体内において異常収縮が発生する平滑筋細胞に直接作用するには、Fisetin が内皮細胞を透過する必要があるため、内皮細胞層透過性を確認したところ Fisetin は内皮細胞を透過し平滑筋細胞に直接作用可能なことを明らかにした。そのため Fisetin は生体内でも異常収縮

の発生を抑制可能であると考えられたが、わずか数分で発生する異常収縮に対して、Fisetin は約半量が内皮細胞層を透過するのに 1 時間近く要した。しかし本測定系においては短時間で Fisetin の透過量が測定困難なため、今後、膜電位測定等により透過量を確認する必要があるが、短時間で多くの Fisetin が平滑筋細胞に到達するのは困難であると考えられた。そのため Fisetin により異常収縮を予防するには、最大血中濃度や共培養時間を考慮しても、Fisetin が血中に常に存在するために常時摂取する必要があると考えられた。

また血管異常収縮予防に対する Fisetin の特性を解明するため、活性部位の特定を試みたところ、C 環 3 位の水酸基が活性部位である可能性が考えられた (Fig. 2-10)。In silico で細胞膜を構成する脂質二重層に対して Fisetin は C 環 3 位の水酸基を接触部として相互作用することが報告されている[65]。そのため、Fisetin の C 環 3 位の水酸基は脂質二重膜との相互作用に影響を及ぼし、異常収縮予防効果を示していると考えられた。しかし、Fisetin の活性部位が C 環 3 位の水酸基であるか明らかにするためには、C 環 3 位の水酸基をメチル化したメトキシフラボンなどを用いた確認が必要と考えられる。また Fisetin の関連化合物も異常収縮予防効果を示した (Fig. 2-10) ため、これらが Mulberry leaves(>20-year-old trees)に含まれているか確認したところ、Fisetin の他に Robinetin が含まれており、Robinetin は Tea leaves に多く含まれ、特に Fruit に多く含まれることを明らかにした。Fisetin と Robinetin は非常に類似した構造を有するため、同じフラボノイド合成経路で Fisetin と Robinetin が生成されている可能性がある[66]。

以上の結果より、桑に含まれる Fisetin は日常的に摂取可能な濃度で異常収縮を予防することを明らかにした。SPC による異常収縮の発生を予防する食品由来成分はこれまで報告がなく、桑や Fisetin を栄養補助食品として日常的に摂取することで血管異常収縮が予防されることが期待される。また Fisetin の活性部位が絞り込めたことから、今後、リード化合物として創薬への活用も期待される。

## 第三章 血管異常収縮の発症機構と桑葉由来成分による予防機序の解析

### 3.1. 緒論

これまでの研究で Fisetin による SPC 誘発性異常収縮に対する予防効果を明らかにしたが、その作用機序については未解明である。Fisetin は血管内皮細胞層を透過して平滑筋細胞に直接作用するが、平滑筋細胞や異常収縮の原因分子 SPC との詳細な分子間相互作用については明らかでない。また、これまでの研究で SPC による血管異常収縮の発症機序への細胞膜上マイクロドメインの関与が血管組織レベルで示唆されてきたが[21]、異常収縮が起きる血管平滑筋細胞で細胞膜上マイクロドメインがどのような機能を果たしているのかは未解明である。さらに血管平滑筋細胞における異常収縮の原因分子 SPC による作用機構も明らかではなく、Fisetin による予防機序の解明を難しくしている。そこで本研究では、Fisetin を活用して SPC による異常収縮の発症機構と Fisetin による予防機序の同時解明を目指した。

### 3.2. 実験方法

#### 3.2.1. 細胞培養

HCASMCs を 2.2.3.と同様に 37℃、CO<sub>2</sub>濃度 5%に設定したインキュベーターで培養し実験に用いた。Fisetin による異常収縮予防効果を確認する際は、2.3.5.の結果より 1 μM 以上で異常収縮を予防する傾向が確認されたため、細胞播種約 24 時間後に 1 μM Fisetin を曝露し、共培養した細胞で評価した。異常収縮予防効果は、細胞が 80-90%コンフルエントに達した後、HuMedia-SB2 に置換し、一晚培養後、30 μM SPC で 10 分間刺激し確認した。Fisetin と共培養した細胞においては、1 μM Fisetin を含む HuMedia-SB2 に置換した。また、Fisetin と SPC の相互作用を確認するため、あらかじめ Fisetin と SPC を混合した Premix 溶液を SPC の代わりに用いて異常収縮予防効果を確認した。さらに細胞膜上マイクロドメインの関与を明らかにするため、HuMedia-SB2 に溶解した Methyl-beta-cyclodextrin (MβCD; 富士フイルム和光純薬工業株式会社) で平滑筋細胞を処理し、細胞膜上コレステロールを除去することでマイクロ

ドメインを破壊した。M $\beta$ CD による処理条件は、血管組織[21]や平滑筋細胞[67]におけるこれまでの研究報告をもとに検討した。これらの処理による異常収縮の発生は倒立顕微鏡 CKX53 (株式会社オリンパス) にて SPC 刺激前後の細胞画像を取得し、細胞形態を観察した。

### 3.2.2. フローサイトメトリー (Flow cytometry; FCM)

3.2.1.と同様に細胞を処理後、スクレーパーで回収し HEPES 緩衝液で洗浄した。洗浄した細胞は同緩衝液に懸濁した (細胞懸濁液)。細胞懸濁液に Nitrobenzoxadiazole (NBD)-SPC を添加し 37 °C に設定した湯浴中で 10 分間反応させた後、1% BSA 含有 PBS で 2 回洗浄し、1% Paraformaldehyde 含有 PBS で固定した。測定は BD FACSCalibur (BD Biosciences) または Attune NxT (Thermo Fisher Scientific) にて行った。解析は forward scatter (FSC) 及び side scatter (SSC) で、生細胞集団のうち収縮細胞 (Ec) と非収縮細胞 (Euc) を分画し、各集団の細胞数を用いて以下のように収縮細胞率を算出した。

$$\text{収縮細胞率(\%)} = Ec / (Ec + Euc) \times 100$$

### 3.2.3. 表面プラズモン共鳴法 (Surface plasmon resonance; SPR)

Amine Coupling Kit (Cytiva) を用いて Sensor Chip CM5 (Cytiva) に SPC を固定した。アナライトは 25 °C、流速 10  $\mu$ L/min で注入し、DMSO に溶解した 100  $\mu$ M Fisetin と SPC の分子間相互作用を解析した。陽性対照として HBS (Cytiva) に溶解した RNA アプタマー (GGGGAAAGCCUACCGUUAUUGGAGUAAAAACCCC) [68]を使用した。分子間相互作用解析は、Biacore T200 (Cytiva) にて解析ソフト Biacore T200 Evaluation Software 1.0 (Cytiva) を用いて行った。

### 3.2.4. 共培養細胞における Fisetin 含有量測定

3.2.1.と同様に細胞を処理後、培養上清を回収しメタノールにて細胞を溶解した (細胞溶解液)。培養上清及び細胞溶解液を濃縮乾固後、乾固物を同量の 0.1 % TFA 及びメタノール等量混合液で溶解し、2.2.6.と同様の方法で Fisetin 含量を HPLC-UV により測定した。また得られ

た定量値から Fisetin 添加量に対する存在比を算出した。

### 3.2.5. ライブセルイメージング

コラーゲンコートしたカバーガラスに細胞を播種し、3.2.1.と同様に細胞を処理後、核を 4',6-Diamidino-2-phenylindole, dihydrochloride (DAPI; シグマアルドリッチ合同会社) で 30 分以上染色した。観察直前に、100 倍希釈した PlasMem Bright Red (株式会社同仁化学研究所) で細胞膜を、生細胞でもエンドソームを染色可能な 4  $\mu$ M FM4-64 (シグマアルドリッチ合同会社) でエンドソームを染色し、HEPES 緩衝液で洗浄後、NBD-SPC (Cayman Chemical Company) により誘導される異常収縮を蛍光顕微鏡 BZ-X810 (株式会社キーエンス) で観察した。NBD-SPC は、SPC の C6 位に蛍光物質である NBD を標識した化合物である。SPC は蛍光観察が困難で、NBD-SPC も SPC と同様に異常収縮を誘発するため、SPC の代用として使用し細胞内動態を観察した[69]。

### 3.2.6. ウェスタンブロッティング

3.2.1.と同様に処理した細胞を ULTRARIPA kit (BioDynamics) を用いて、マイクロドメインとその他の細胞膜成分に分画した。これらの画分は、4×sample buffer (400 mM Tris, pH 6.8、8% Sodium dodecyl sulfate (SDS)、40% glycerol、24% 2-mercaptoethanol、0.1% bromophenol blue) に溶解し 95 ° C で 5 分間還元処理を行い、15% SDS-PAGE で分離後、Immun-Blot PVDF Membrane (Bio-Rad) に転写し、5%スキムミルク含有 Tris-buffered saline-Tween 20 (TBS-T) により室温で 1 時間ブロッキングした。抗体反応は、一次抗体として anti-caveolin-1 (1:1000、610057、BD Biosciences) または、anti-flotillin-1 (1:1000、sc-133153、Santa Cruz Biotechnology)、anti- $\beta$ -actin (1:5000、5125S、Cell Signaling Technology) を、4 °C で一晩反応させた。また二次抗体は、HRP-conjugated anti-mouse Ig (1:5000、554002、BD Biosciences) または、HRP-conjugated anti-mouse IgG (1:5000、sc-525408、Santa Cruz Biotechnology)、HRP-conjugated anti-rabbit IgG (1:5000、7074S、Cell Signaling Technology) を室温で 2 時間反応させ、Clarity Western ECL Substrate (Bio-Rad) で発光後、Bio-Rad ChemiDoc XRS+ (Bio-Rad) で検出及び解析を行った。

メンブレンの洗浄や抗体の希釈には TBS-T を用いた。

### 3.2.7. エクソソームの単離と検出

HCASMCs を 80-90%コンフルエントになるまで培養し、HEPES 緩衝液で洗浄後、HuMedia-SB2 に切り替え約 24 時間培養し、培養上清を全量回収した。培養上清は、4 °C、10,000×g で 30 分間遠心分離後、上清を回収し、細胞断片や夾雑物を除去した。さらに回収した上清をスイングロータ TLS-55 (Beckman Coulter) 及び Optima-TL (Beckman Coulter) を使用して、4 °C、213,863×g で 26 分間超遠心分離し、上清を除去した。回収した上清がなくなるまでこれを繰り返し、完了後、HEPES 緩衝液を添加して同条件で超遠心分離を行い、エクソソームを回収した。回収したエクソソームは FITC CD9 (312103、BioLegend) 及び APC CD63 (353007、BioLegend) で表面抗原を染色し、FACSCalibur (BD Biosciences) で測定した。

### 3.2.8. 統計処理

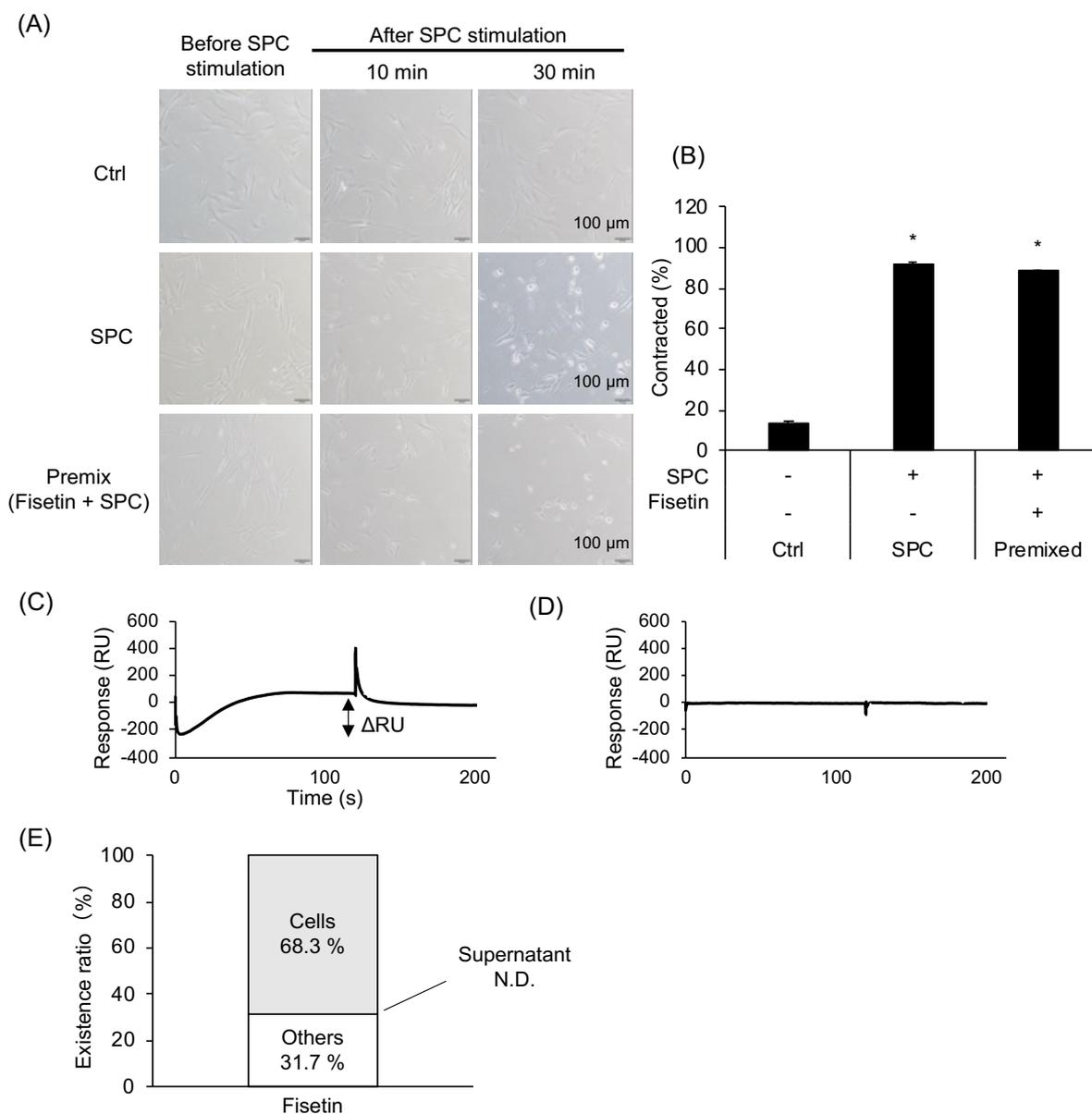
全ての統計解析は、Microsoft Office Excel 2019 を使用して行った。データ解析は、Tukey-Kramer 法による多重比較検定を行った。

## 3.3. 結果

### 3.3.1. Fisetin と HCASMCs の相互作用

SPC と Fisetin の相互作用を明らかにするため、あらかじめ SPC と Fisetin を混合した Premix 溶液を Fisetin 処理していない HCASMCs に曝露し異常収縮の発生を確認した。その結果、SPC のみを曝露した細胞と同様に Premix 溶液を曝露した細胞でも刺激 10 分後には異常収縮が発生した (Fig. 3-1A)。これは FCM による細胞収縮率測定でも同様の結果が得られ、SPC 刺激や Fisetin 処理をしていない Ctrl 細胞では細胞収縮率が 13.4%だったのに対し、SPC 刺激細胞では 92.1%、Premix 溶液で刺激した細胞は 88.9%で、SPC 刺激した細胞と Premix 溶液で刺激した細胞では同様に細胞が収縮することを確認した (Fig. 3-1B)。次に、SPC と Fisetin の分子間相互作用を SPR により解析したところ、陽性対照である RNA アプタマーは SPC と相互作用

用し結合曲線を形成した (Fig. 3-1C) のに対し、Fisetin は結合曲線を形成せず (Fig. 3-1D)、Fisetin と SPC が相互作用しないことを明らかにした。さらに Fisetin と共培養した血管平滑筋細胞における Fisetin 含有量を測定したところ、全体の 68.3%が細胞に含まれ培養上清からは検出されなかった (Fig. 3-1E)。

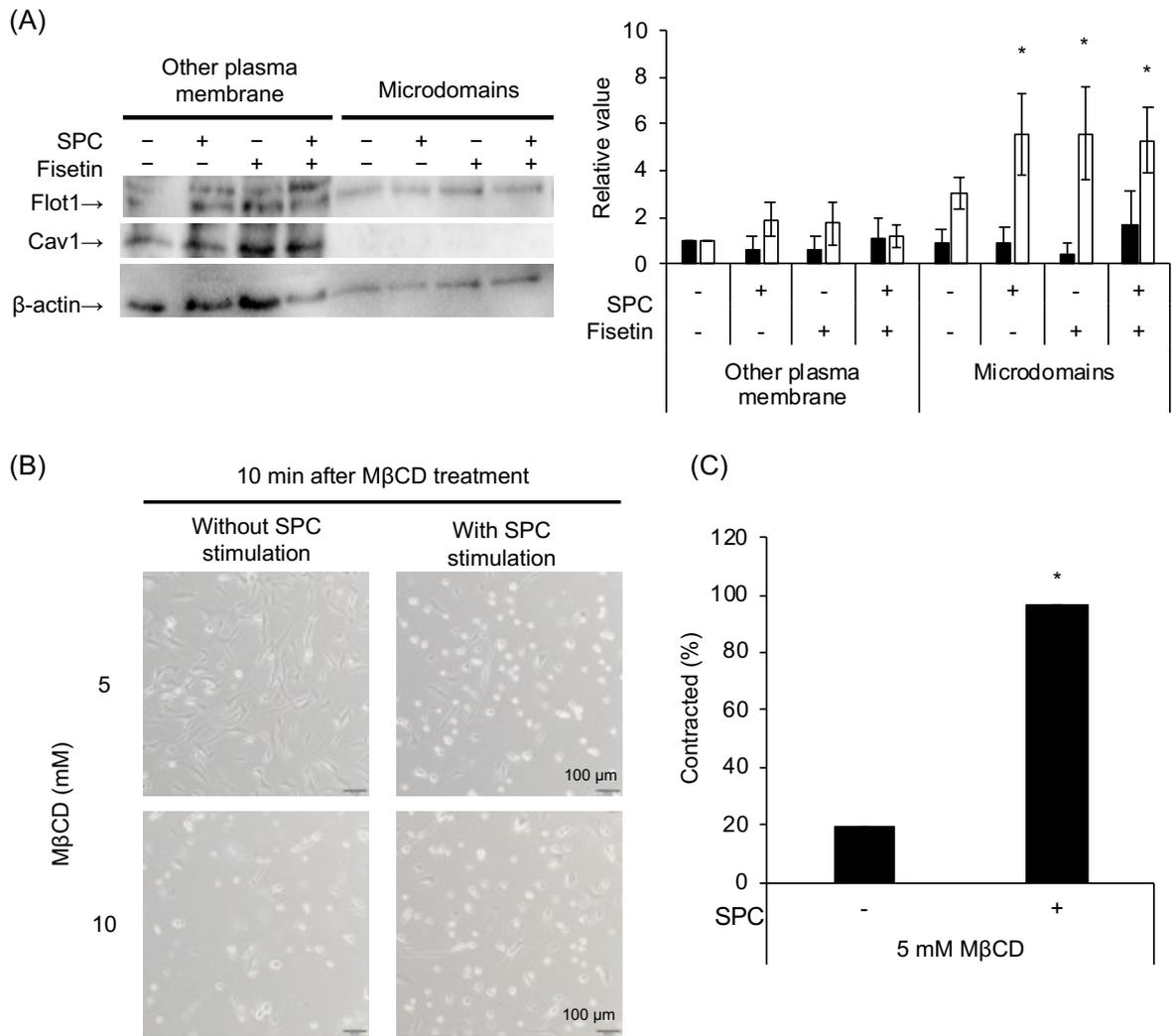


**Figure 3-1 The interaction between fisetin and sphingosylphosphorylcholine (SPC).**

(A) Morphological observation of the effect of fisetin to SPC. Ctrl indicates the induction of abnormal contraction without the addition of fisetin. (B) Contracted cell rates using flow cytometry. (C) The interaction analysis between SPC and RNA aptamer. (D) The interaction analysis between SPC and fisetin. (E) Quantitative analysis data of fisetin included in cells or supernatant of fisetin treated cells. Data are represented as mean  $\pm$  S.D. ( $n = 3$ ); \* $p < 0.05$  vs. Ctrl (induction of abnormal contraction without the addition of samples)

### 3.3.2. SPCによる異常収縮への細胞膜上マイクロドメインの関与

細胞膜上における SPC や Fisetin の作用点を探索するため、これまで異常収縮との関連性が示唆されてきた細胞膜上マイクロドメインに着目した。細胞膜上マイクロドメインはマーカタンパク質 Caveolin1 (Cav1) や Flotillin1 (Flot1) を有することが報告されているため[70]、それらの発現解析をウエスタンブロッティング法にて行った。その結果、マイクロドメインには Cav1 より Flot1 の方が多く検出され、マイクロドメイン画分においては SPC 刺激をしていない試料と比べ SPC 刺激により発現量が増加した。一方、Fisetin 処理細胞では SPC 刺激によらず Fisetin 未処理細胞に比べマイクロドメイン画分の Flot1 発現量が高かった (Fig. 3-2A)。そこでマイクロドメインの異常収縮への関与を明らかにするため、マイクロドメインの主成分であるコレステロールを M $\beta$ CD により除去しマイクロドメイン破壊細胞を作製した。M $\beta$ CD 処理は 10 mM で 10 分間処理すると、SPC 刺激によらず細胞傷害性が確認され細胞収縮や剥離が確認されたが、5 mM では傷害性が確認されなかった。そのため、5 mM M $\beta$ CD で 10 分間処理し、マイクロドメイン破壊細胞を作製後、SPC 刺激により異常収縮が発生するか確認したところ、マイクロドメイン破壊細胞でも異常収縮が発生することを確認した (Fig. 3-2B)。これは FCM による細胞収縮率測定でも同様の結果が得られ、SPC 刺激をしていない M $\beta$ CD 処理細胞では 19.0%、SPC 刺激した M $\beta$ CD 処理細胞では 96.7%の細胞が収縮することを明らかにした (Fig. 3-2C)。

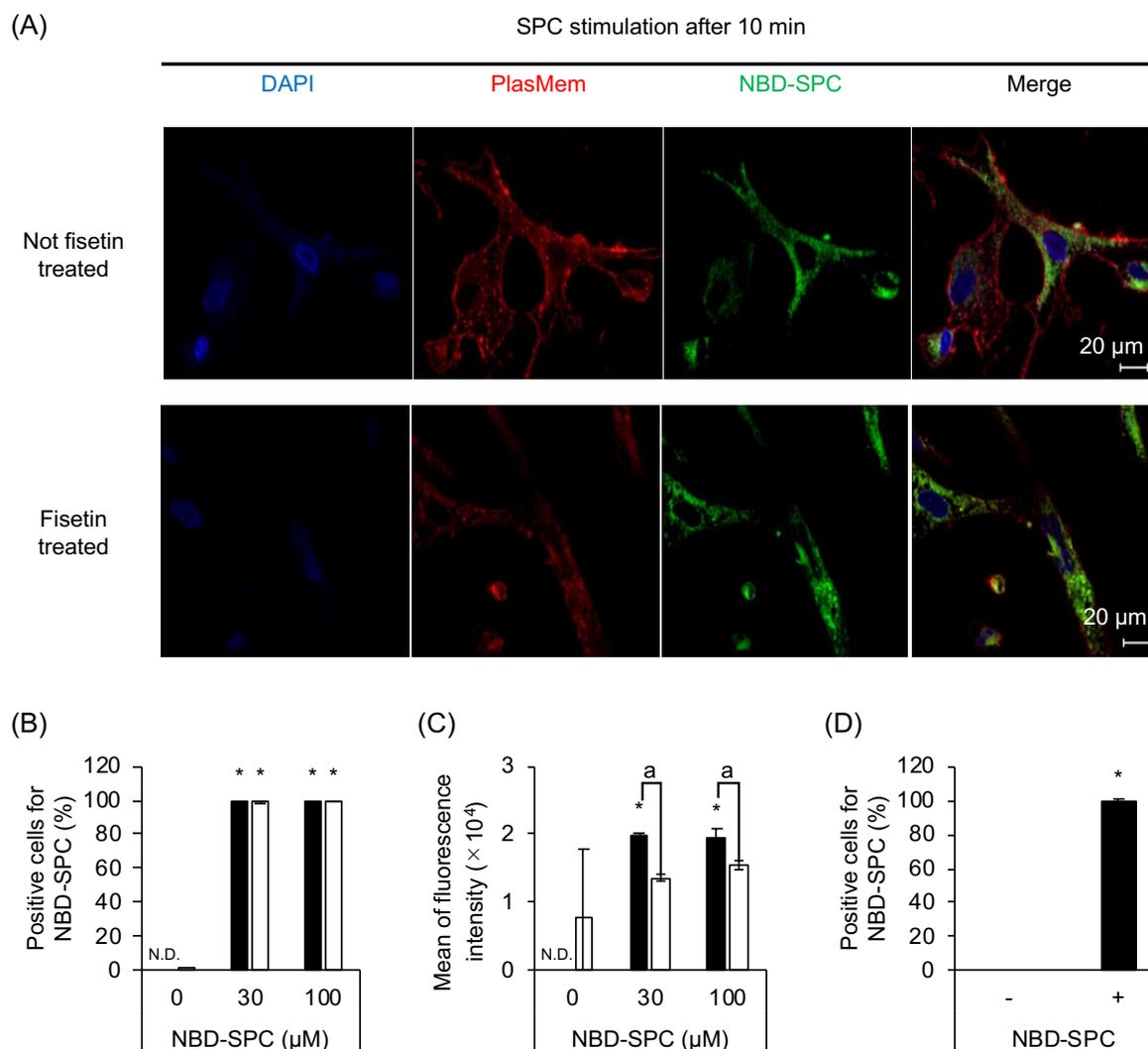


**Figure 3-2 Analysis of microdomain involvement in sphingosylphosphorylcholine (SPC)-induced contractions of human coronary artery smooth muscle cells (HCASMCs).**

(A) Expression levels of the microdomain markers flotillin-1 (Flot1) and caveolin-1 (Cav1). Black and white indicate Cav1 and Flot1, respectively. (B) HCASMCs treated with 5 mM (top row) or 10 mM (bottom row) methyl- $\beta$ -cyclodextrin (M $\beta$ CD). The left and right columns depict unstimulated and SPC-stimulated cells, respectively. (C) Contracted cell rates of the cells with microdomains disrupted by 5 mM M $\beta$ CD. \* $p < 0.05$  vs. without SPC stimulation and fisetin treatment or SPC stimulation. Data are represented as mean  $\pm$  S.D.

### 3.3.3. SPC の局在解析

Fisetin や SPC の HCASMC 周辺での作用点を探索するため、SPC を蛍光標識した NBD-SPC を用いて細胞膜周辺での SPC の局在解析を行った。その結果、マージした蛍光観察画像において、Fisetin 処理の有無によらず細胞膜 (Red) の内側に NBD-SPC (Green) が位置することから、Fisetin 処理によらず添加 10 分後には NBD-SPC が細胞内に取り込まれることを明らかにした (Fig. 3-3A)。同様に NBD-SPC で処理した細胞の FCM による細胞収縮率測定でも、NBD-SPC を添加していない細胞 (0  $\mu$ M NBD-SPC) に比べ NBD-SPC 処理細胞では、NBD-SPC 濃度によらず NBD-SPC 陽性率が高く、30  $\mu$ M NBD-SPC 処理細胞では、収縮細胞 (Black) において 99.9%、非収縮細胞 (White) において 99.9%、100  $\mu$ M NBD-SPC 処理細胞では収縮細胞において 100%、非収縮細胞において 100%と、異常収縮の発生に関わらず NBD-SPC と HCASMC が相互作用することを明らかにした (Fig. 3-3B)。さらに NBD-SPC 陽性細胞における蛍光強度の平均値を解析したところ、30  $\mu$ M もしくは 100  $\mu$ M NBD-SPC を添加した細胞では、収縮細胞の方が高値であった (Fig. 3-3C)。また、NBD-SPC の作用部位にマイクロドメインが関与していないか確認するため、M $\beta$ CD 処理によりマイクロドメインを破壊した細胞においても同様に NBD-SPC 陽性率を測定したところ、陽性率が 96.3%であった (Fig. 3-3D)。



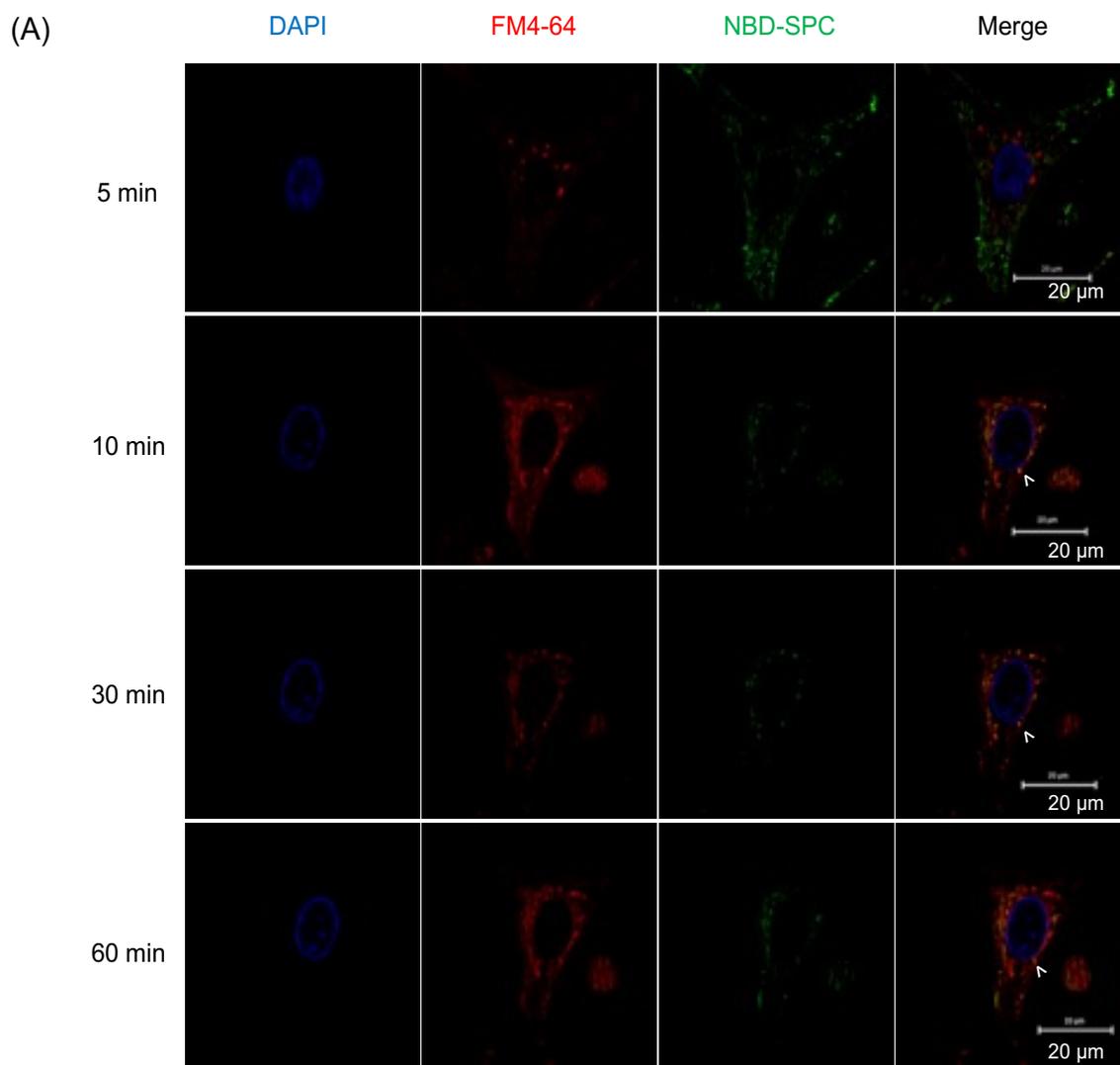
**Figure 3-3 Localization of sphingosylphosphorylcholine (SPC) in human coronary artery smooth muscle cells (HCASMCs).**

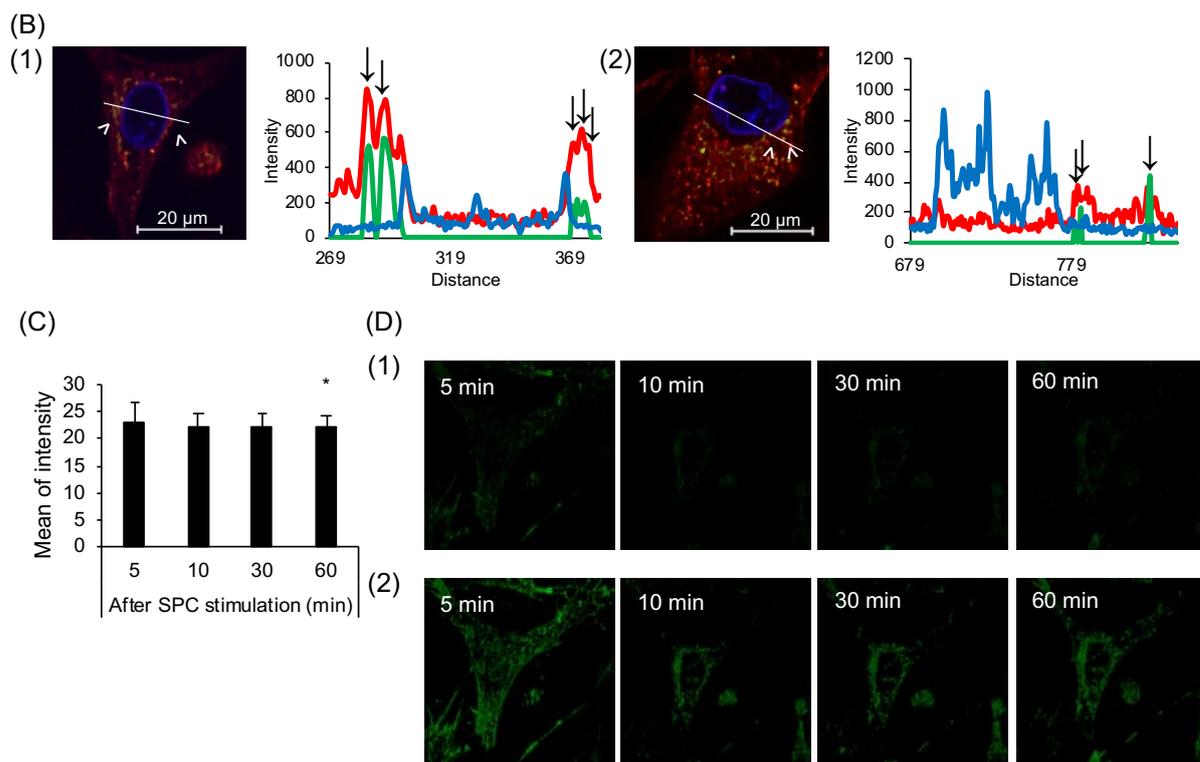
(A) Representative image of NBD-SPC (green) localization in abnormally contracting HCASMCs. DAPI (blue), nuclear stain; PlasMem Bright Red (red), plasma membrane stain. The top and bottom rows depict untreated control (ctrl) cells and fisetin-treated cells. (B) Percentage of positive cells for NBD-SPC. (C) Mean fluorescence intensity of NBD-SPC. (D) Flow cytometric analysis of NBD-SPC-positive cells treated with 5 mM MβCD. Black and white indicate the number of abnormally contracting and non-contracting cells, respectively. \* $p < 0.05$  vs. 0 μM NBD-SPC-treated cells and a:  $p < 0.05$  vs. abnormally contracting cells. N.D., not detected. Data are represented as mean ± S.D.

### 3.3.4. SPC の細胞内移行へのエンドサイトーシスの関与

SPC の細胞内移行経路にエンドサイトーシスが関与しているか確認するため、エンドソーム (Red) と NBD-SPC (Green) を共染色した HCASMC をライブセルイメージングにより観察した。NBD-SPC は、曝露 5 分後は細胞膜周辺に存在したが、曝露 10 分後には核周辺に移行しエンドソームと共局在した。また NBD-SPC のクラスターも減少し、曝露 10 分後にはク

ラスターがエンドソームと共局在し、添加 60 分後まで継続した (Fig. 3-4A)。これは Fisetin 処理した細胞でも同様に観察され、Fisetin 未処理細胞と Fisetin 処理細胞の蛍光プロファイル解析においても、確かに NBD-SPC とエンドソームが共局在していることを確認した (Fig. 3-4B)。そのため、エンドサイトーシスにより細胞内に取り込まれた NBD-SPC が細胞外に放出されていないか確認するため、NBD-SPC の蛍光強度を測定したところ、NBD-SPC 添加 30 分後まで蛍光強度に変化がなかったが、60 分後には減少した (Fig. 3-4C, D)。



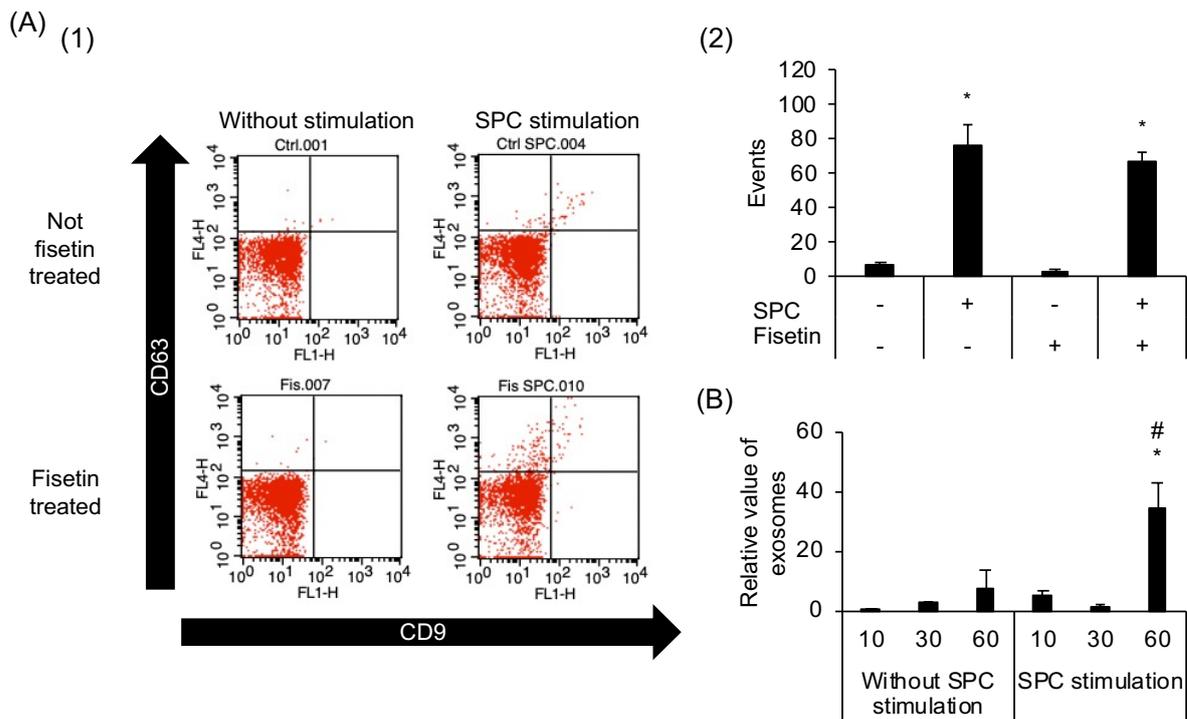


**Figure 3-4 Cellular uptakes of sphingosylphosphorylcholine (SPC).**

(A) Cellular uptake of nitrobenzoxadiazole (NBD)-SPC via endocytosis. Representative images indicate the localization of endosomes (red), NBD-SPC (green), and the nucleus (blue). Top to bottom row: cells visualized 5, 10, 30, and 60 min after SPC stimulation. (B) The histogram shows the fluorescence profile for the enlarged image, illustrating the fluorescence intensity in each channel for endosomes (red line), NBD-SPC (green line), and the nucleus (blue line) against the distance along the line indicated on the micrograph. Arrows indicate co-localization of NBD-SPC and endosomes. SPC-stimulated human coronary artery smooth muscle cells (HCASMCs) (1) without fisetin treatment and (2) with fisetin treatment. (C) The mean fluorescence intensity of cellular uptake of NBD-SPC after 5, 10, 30, and 60 min of SPC stimulation. (D) (1) Unstacked images of cellular uptake of NBD-SPC (green) after 5, 10, 30, and 60 min of SPC stimulation in figure 3-4A. (2) Contrast-adjusted image of (1). Data are represented as mean  $\pm$  S.D. \* $p < 0.05$  vs 5 min after SPC stimulation.

### 3.3.5. SPCによる異常収縮へのエキソサイトーシスの関与

エンドサイトーシスと連動して起きる可能性が高いエキソサイトーシスの関与を確認した。エキソサイトーシスは、エクソソームのマーカータンパク質である CD9 と CD63 を標識し、CD9+/CD63+集団を FCM にて検出した。Fisetin 未処理細胞では、SPC 刺激していない細胞 (6.7 events) より SPC 刺激した細胞 (75.7 events) の方がエクソソームを多く産生し、それは Fisetin 処理した細胞 (SPC 刺激なし : 2.3 events、SPC 刺激あり : 66.3 events) でも同様であった (Fig. 3-5A)。また SPC 刺激に伴う経時的なエクソソーム産生量は、60 分後には大幅に増加することを明らかにした (Fig. 3-5B)。



**Figure 3-5 The number of exosomes in human coronary artery smooth muscle cells (HCASMCs).** (A) (1) Flow cytometric dot plots representing CD9- and CD63-positive populations. (2) Number of exosomes generated from control (Ctrl) cells and fisetin-treated cells. (B) Number of exosomes in HCASMCs relative to unstimulated Ctrl cells. \* $p < 0.05$  vs. Ctrl without sphingosylphosphorylcholine (SPC) stimulation. # $p < 0.05$  vs. without SPC stimulation at the same time. Data are represented as mean  $\pm$  S.D.

### 3.4. 考察

第二章にて Fisetin が血管異常収縮を予防することを明らかにしたため、その予防機序の解明を目指して Fisetin と SPC 及び HCASMCs の相互作用を確認し作用点を探索した。また SPC の動態解析を行い、SPC による異常収縮への関与が示唆されている細胞膜上マイクロドメインの役割[21]について検討するため、Fisetin と SPC の相互作用を解析した。Fisetin の作用点が SPC である場合、SPC と Fisetin は相互作用し SPC の機能が阻害されるため異常収縮が発生しないと考えられる。しかし、Fisetin と SPC をあらかじめ混合した Premix 溶液でも異常収縮が発生した (Fig. 3-1A,B) ことから、Fisetin は SPC の作用を阻害しないと考えられた。これは分子間相互作用解析においても同様であった (Fig. 3-1D) ため、Fisetin は SPC に直接作用するのではなく細胞に作用し間接的に SPC の機能を阻害していると考えられ、Fisetin の作用点が平滑筋細胞にあると考えられた。実際に Fisetin と HCASMCs を共培養すると、培養上清に比べ細胞溶解液に Fisetin が多く含まれていた (Fig. 3-1E) ことから、Fisetin が HCASMCs

に直接作用している可能性が高いと考えられた。これは、Fisetin をはじめとしたフラボノイド類が細胞膜成分と相互作用するという以前の報告[65]と一致している。なお、HCASMCs と Fisetin の共培養下では、Fisetin は培養フラスコに吸着する可能性も高く、また検出下限を下回ってしまい培養上清に含まれる Fisetin を定量できなかった可能性が考えられるが、いずれにしても Fisetin は細胞と相互作用している可能性が高いと考えられた。一方、Fisetin を含むフラボノイド類は $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA)受容体や peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)受容体に結合する[71,72]ことが報告されているが、受容体や結合タンパク質など、その他の結合分子の存在については報告がない。また細胞膜の多くの面積を占める脂質二重膜と直接相互作用し、細胞膜を透過して細胞内に移行している可能性も考えられる。実際に本研究で着目した細胞膜上マイクロドメインとフラボノイド類との相互作用については多数の報告があり、細胞膜上で金属イオンと錯体を形成することやマイクロドメイン構成脂質との直接的な相互作用が示唆されている[73,74]。しかし、フラボノイド類が細胞膜に作用した後の詳細な作用機構については未解明である。そのため、細胞膜上での Fisetin の明確な作用点を明らかにするには、今後、様々な結合関連分子との相互作用を確認し、標識物質などを用いて細胞膜周辺での Fisetin をはじめとしたフラボノイド類の局在解析をはじめとした作用機構の解明が求められると考える。本研究では、Fisetin が HCASMCs と直接相互作用して SPC による異常収縮を予防していると考えられたため、血管異常収縮との関連性が示唆されてきたマイクロドメインを Fisetin や SPC の細胞膜上での作用点と仮定し、その関与を確認した。その結果、マイクロドメインのマーカータンパク質である Cav1 や Flot1 の発現が異常収縮の発生に関与していなかった (Fig. 3-2A)。そのため、M $\beta$ CD 処理によるマイクロドメイン破壊細胞で異常収縮の発生を確認したところ SPC 刺激により異常収縮が発生した (Fig. 3-2B,C) ことからマイクロドメインは異常収縮の発生と関連していない可能性が考えられた。これまでの研究では、M $\beta$ CD 処理によりコレステロールを除去したヒト血管組織[21]や、高脂肪食を付加したラットに M $\beta$ CD を与えることで食事として摂取されるコレステロール量を減少させたラット血管組織[76]において SPC による異常収縮が発生しないことが報告されているが、

これらはいずれも血管組織のみでの確認に留まり、血管平滑筋細胞での確認は行われていない。実際に血管平滑筋と同様に筋組織である骨格筋においては、生体組織と細胞で代謝の違いがあることが報告されている[75]。そのため、血管平滑筋組織における現象が必ずしも血管平滑筋細胞において一致するとは限らないと考えられた。また血管内膜を除去していない血管組織においてコレステロールの存在が SPC による異常収縮の発生へ影響を与えている報告[21,76]から、血管平滑筋よりも血管内腔側に位置し、血中に存在するコレステロールの影響を受けやすい血管内膜を構成する血管内皮細胞のマイクロドメインが異常収縮に関与している可能性もあると考えられた。ヒト乳癌転移細胞である MCF-7 細胞では、コレステロールを曝露すると細胞収縮を担うミオシン軽鎖のリン酸化が抑制されることや[77]、平滑筋細胞と同じ筋細胞である新生児由来心筋細胞では細胞収縮が阻害されるとの報告があるが[78]、他方、心筋細胞においてはコレステロールの曝露が細胞収縮を促進させるとの報告[79]もあり、コレステロールによる血管平滑筋細胞への影響については慎重を期す必要があると考えられた。本研究では Morikage ら[21]の研究成果を基に細胞膜上マイクロドメインに着目したが、コレステロールによる血管平滑筋細胞への直接的作用について今後更なる検討が求められると考えられた。

一方、SPC 刺激や Fisetin 処理した細胞では Flot1 の発現が増加していた (Fig. 3-2A)。以前の研究で、Flot1 の活性化がエンドサイトーシスを誘導することが報告されている[80,81]。そのため本研究では、Flot1 の発現増加に着目し、SPC や Fisetin が HCASMCs に作用することで、Flot1 の発現を増加させエンドサイトーシスを誘導しているのではないかと考えた。また異常収縮とエンドサイトーシスの関連性を明らかにできれば、細胞膜上での SPC や Fisetin の作用点解明に繋がる。そのため、本研究では、まず SPC の局在を解析し、細胞膜周辺での作用点を明らかにすることを目指した。SPC の局在解析においては SPC は蛍光基を有さないため、本研究では蛍光標識した NBD-SPC を使用した。NBD-SPC の親水基は細胞膜の中性スフィンゴミエリナーゼにより NBD-セラミドに分解されることが報告されているが[82]、NBD と SPC の結合部位であるアミノ基の分解については報告がない。また NBD-SPC は SPC と同様

に異常収縮を引き起こすことから、NBD が結合している SPC のアミノ基は、SPC による異常収縮の発生において活性部位でないと考えられた (Fig. 3-3A)。以上のことから、NBD-SPC が異常収縮に対する SPC の機能と同等であると考えられたため、NBD-SPC を使用して SPC の作用点探索を行った。その結果、NBD-SPC は Fisetin 処理に関係なく細胞内に取り込まれたため、SPC の細胞内取り込みは異常収縮の発生に関係しないと考えられた。以上のことから、収縮細胞と非収縮細胞のどちらにも NBD-SPC は作用するが、細胞膜上の作用部位により異常収縮を誘発する SPC と誘発しない SPC の選択が行われ、NBD-SPC の作用量が収縮細胞と非収縮細胞で異なるのではないかと考えられた。そのため両者の蛍光強度が NBD-SPC の細胞膜への作用量や細胞内への取り込み量と比例していると考え蛍光強度の平均値を算出した結果、収縮細胞と比べ非収縮細胞は蛍光強度の平均値が低く、収縮細胞は NBD-SPC がより作用しやすいことを確認した (Fig. 3-3C)。また M $\beta$ CD 処理によりコレステロールを除去した細胞においても、NBD-SPC の陽性率は高値 (Fig. 3-3D) で、マイクロドメイン破壊細胞でも NBD-SPC が作用していることが確認できたことから、マイクロドメインに関係なく NBD-SPC が HCASMCs に作用していると考えられ、細胞膜上マイクロドメインが SPC の作用部位である可能性は低いと考えられた。なお、M $\beta$ CD 処理ではコレステロールが除去されることから、NBD-SPC とコレステロールは相互作用していないと考えられた。

次に、NBD-SPC の細胞内取り込みについて確認したところ、NBD-SPC はエンドサイトーシスにより細胞内に取り込まれるだけでなく、曝露 5 分後は細胞表面付近に局在していたが、曝露 10 分後以降は核周辺に移行し、細胞内に留まり続けることを明らかにした (Fig. 3-4A)。さらに NBD-SPC 曝露 5 分後から 10 分後にかけて細胞付近に存在する NBD-SPC が減少したことから、曝露 5~10 分後にかけて、NBD-SPC の細胞膜上での作用部位によって細胞内に移行する NBD-SPC と移行せず解離もしくは消化される NBD-SPC の選択が行われているものと考えられた。Fig. 2-8 にあるように異常収縮は SPC 刺激 5~10 分後に大きな変化が見られる。そのため細胞膜上での SPC の作用部位が収縮細胞と非収縮細胞に選別しており、これらが異常収縮の発症機構と関与していると考えられた。以上より SPC の細胞内移行にエンドサイト

ーシスの関与が確認されたため、次に、トランスサイトーシスの関与について確認した。細胞内に取り込まれた初期エンドソームは、後期エンドソームを経てリソソームやゴルジ体に取り込まれたり、分泌小胞として細胞外に排泄されたりする。特に分泌小胞として細胞外へ排泄される細胞内の一連の流れはトランスサイトーシスと総称され、エンドサイトーシスにより細胞内に取り込まれた小胞を細胞外に排出する仕組みである[83]。そのため、本研究では細胞内に取り込まれた SPC の行方を追うためトランスサイトーシスの関与を確認したところ、エンドサイトーシスにより細胞内に取り込まれた NBD-SPC は、細胞内に留まり続け細胞外へ漏出しないことを確認した (Fig. 3-4C,D) ことから、NBD-SPC のトランスサイトーシスは起きていないと考えられた。しかし、エンドソームとして取り込まれた NBD-SPC が細胞内のリソソームやゴルジ体に取り込まれ、NBD-SPC のエンドサイトーシスに伴いエキソサイトーシスが発生する可能性が考えられたため、SPC で異常収縮を誘発した細胞でエキソサイトーシスが発生しているか確認した。エキソサイトーシスで産生されるエクソソームは、細胞の分泌物として常時産生されている[84]。エクソソームは近年注目を集め、様々なマーカータンパク質や miRNA を含み細胞間コミュニケーションに寄与していると考えられている。SPC は常に生体内に存在しているが、生体内濃度が上昇したり、未解明ではあるがその他のイベントが発生したりすると、異常収縮が発生すると考えられている。特に血管平滑筋は、平滑筋細胞の集合体であり細胞間コミュニケーションにより収縮・弛緩している。そのため、細胞間コミュニケーションを担うとされているエクソソームを SPC 刺激細胞から確認することができれば、血管組織における異常収縮の発症機序解明につながると考えた。そこで、SPC 刺激や Fisetin 処理を施した細胞のエクソソーム産生量を確認したところ、Fisetin 処理によらず SPC 刺激によりエクソソームが産生されることを確認した (Fig. 3-5A)。またエクソソームは、SPC 刺激に依らず時間依存的に増加することを確認し、特に SPC 刺激した細胞では、刺激 60 分後には SPC 未刺激時に比べ 4 倍相当エクソソーム産生量が増加した (Fig. 3-5B)。しかし、SPC 刺激 30 分後の細胞においては、刺激 10 分後の細胞に比べ、エクソソーム産生量が減少傾向出会った。細胞外へ排出されたエクソソームは再び細胞内に取り込まれリサイクルされ

ることが報告されている[85]。そのため SPC 刺激によりエクソソームのリサイクルが起きているのではないかと考えられた。エクソソームのリサイクルを特定するには、エクソソーム特有のタンパク質や miRNA などを同定し、追跡することで証明できると考えられ、今後検討を進める必要がある。また SPC により刺激された細胞においては最終的に細胞死が起きることから、SPC 刺激 60 分後の細胞でエクソソーム産生量が増加したのは、異常収縮に伴う細胞死が関係している可能性が考えられる。そのため、エンドサイトーシスにより細胞内に取り込まれた NBD-SPC は細胞内に留まるが、小胞内で分解された NBD-セラミドや細胞内に取り込まれたタンパク質や miRNA など他の物質はトランスサイトーシスを受け、エクソソームとして細胞外に排出されると考えられた。

以上のことから、本章では SPC による異常収縮の発症機構と Fisetin による予防機序の同時解明を目指した結果、Fisetin が SPC ではなく HCASMCs に直接作用し、間接的に血管異常収縮の発生を抑制していることや、Fisetin 処理によらず SPC が細胞内にエンドサイトーシスにより取り込まれ、SPC を含まないエクソソームが産生されることを明らかにすることができた。しかしながら、これらが SPC による異常収縮の発症機序と直接関与しているのか明らかにするには至らず、Fisetin による異常収縮予防機序の解明も困難であった。そのため、今後、SPC による異常収縮に伴う SPC を含むエンドソームやエクソソームのタンパク質や RNA など詳細な解析により、その作用機構の解明が求められる。

## 第四章 総括

桑葉は桑茶としてアジアやヨーロッパを中心に飲食されてきた。その生理作用は様々な分野において報告されてきた[42]が、本研究で見出した血管の異常収縮に対する予防効果については新たな生理作用である。特に、Mulberry leaves(>20-year-old trees)に異常収縮を予防する傾向があることを明らかにしており、樹齢の違いによる生理活性への影響は他の植物では報告されている[86]が、桑葉での報告はない。さらに Mulberry leaves(>20-year-old trees)に含まれる異常収縮予防成分がフラボノイド類の Fisetin であることを同定し、その活性部位が C 環 3 位の水酸基である可能性が考えられた。これまでの研究では Fisetin と類似した構造を持つ Quercetin や Luteolin についての桑への含有報告はあったが Fisetin については報告がなく、桑に Fisetin が含まれるというのは新たな発見である。また異常収縮予防成分として同定した Fisetin は、これまで多く含まれると考えられてきたイチゴやリンゴに比べ桑葉に多く含まれることから、異常収縮を予防する食品として桑葉の有効活用が期待される。Fisetin をはじめとしたフラボノイド類は、通常、天然物に配糖体として含有されているが、Mulberry leaves(>20-year-old trees)の桑葉には配糖体ではなくアグリコンとして含有されていることを明らかにした。そのため、アグリコンである Fisetin の生体内への吸収経路や効率を考慮する必要があるが、ヒトにおける経口摂取後の Fisetin の体内動態は未解明である。現在、ヒトを対象とした Fisetin の臨床試験が米国の複数の研究グループで進行中である[87,88]が、マウスやラットでの最大血中濃度の報告から、本研究で明らかにした 1  $\mu$ M 以上での異常収縮予防効果は生体内で実現可能なものと考えられた。また経口摂取された Fisetin は小腸で吸収され血中を介して血管組織に作用するが、血中に取り込まれた Fisetin が血管平滑筋細胞に直接作用するにはさらに血管内腔を構成する血管内皮細胞層を透過する必要があるため確認したところ、Fisetin は血管内皮細胞層を透過して平滑筋細胞層に到達可能であることを本研究で明らかにした。これは、Fisetin による異常収縮予防の生体内での実現可能性をより強固なものにすると考えられる。以上のことより、SPC による異常収縮予防において桑葉は Fisetin を豊富に含む食材とし

て期待されるが、樹齢や加工方法などにより活性が異なるため、今後、桑葉を有効活用するには品質管理が求められると結論付けた。

次に SPC による異常収縮の発症機構と Fisetin による予防機序の同時解明を目指して、血管平滑筋細胞膜周辺における Fisetin や SPC の作用点を探索したところ、Fisetin は平滑筋細胞に直接作用している可能性が高いことを明らかにした。また、これまで SPC の作用点として異常収縮への関与が考えられてきた細胞膜上マイクロドメインは、異常収縮の発症機構や Fisetin による異常収縮予防機序に直接関与していない可能性が高いことを明らかにした。さらに SPC により異常収縮した細胞では、SPC を蛍光標識した NBD-SPC がエンドサイトーシスにより細胞内に取り込まれ、取り込まれた NBD-SPC は細胞内に留まり続けたため、NBD-SPC のトランスサイトーシスが発生しないことも明らかにした。なお血管平滑筋細胞は、SPC 刺激に関わらず細胞の生理的作用によりエクソソームを産生しているため、NBD-SPC と共に細胞内に取り込まれたタンパク質や miRNA などがトランスサイトーシスを受け、エクソソームとして細胞外に排出されている可能性もあると考えられた。そのため、SPC 刺激や Fisetin 処理した細胞においてエクソソームの産生を確認したところ、Fisetin 処理によらず SPC 刺激した細胞で多く産生されていたことから、エンドサイトーシスによる SPC の細胞内移行やエクソソームの産生は SPC による異常収縮の発症機構や Fisetin による予防機序ではなく、平滑筋細胞に作用した異物の排除機構として機能している可能性もあると考えられる。

以上より、Mulberry leaves(>20-year-old trees)に含まれる Fisetin が血管異常収縮を予防する可能性が高く、その作用点が平滑筋細胞膜上に存在することや、異常収縮をもたらす SPC がエンドサイトーシスにより細胞内に取り込まれることを明らかにした (Fig. 4)。食品由来成分による疾病予防は、既に食経験のある食品を活用することで実現可能なため、医薬品と比べ実現性が高い他、誰でも気軽に取り組むことができる。しかし、その適切な摂取方法や実現可能性については今後更なる研究が求められると考えるが、様々な食品由来成分による機能的作用について明らかにし、その機能性について網羅的に解明することで、今後、健康診断結果と合わせて不足する機能性成分を補うオーダーメイドでの健康管理サービスの提供な

どが期待される。また SPC による異常収縮細胞特異的に産生されるエクソソームは、その詳細な解析を進めることでバイオマーカーとしての活用が望まれ、将来的に診断手法として用いることが期待される。そのため、本研究成果を基に循環器疾患を引き起こしやすい人を特定し、循環器疾患を発症する前に桑葉をはじめとした Fisetin を含む食品を摂取することで、医療費の削減や健康寿命の延伸に貢献できると考える。

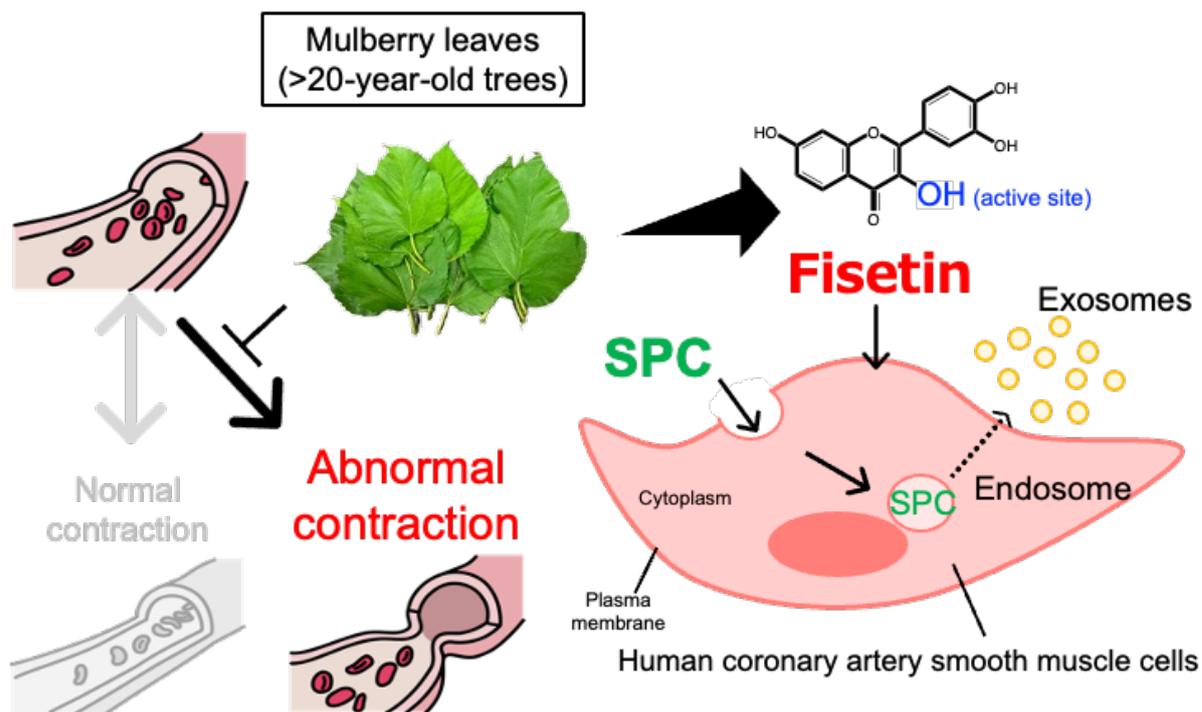


Figure 4 Graphical summary of this research

## 謝辞

本研究を行うにあたり、ご指導ご鞭撻、並びに研究者としての在り方を賜りました鹿児島大学農学部 加治屋勝子研究教授に深甚なる謝意を表します。

本論文の審査並びにご指導、ご助言を賜りました鹿児島大学農学部 南雄二准教授、八木史郎名誉教授、北原兼文教授、鹿児島大学水産学部 塩崎一弘准教授、琉球大学農学部 和田浩二教授に厚く感謝致します。

NMR 測定を行っていただきました株式会社カネカ、分子間相互作用装置を使用させていただきました大阪大学大学院理学研究科 戸所泰人様に厚く御礼申し上げます。

本研究を遂行するにあたり、苦楽をともにした生分子機能学研究室の卒業生、在校生諸氏に厚く御礼申し上げます。また陰ながら支えて下さりました皆様に謝意を表します。そして、博士課程での研究期間で資金援助を賜りました独立行政法人日本学術振興会に深甚なる謝意を表します。

## 参考文献

1. World Health Organization. Cardiovascular diseases (CVDs). Available from: [https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-\(cvds\)](https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-(cvds)). Accessed: 21 Feb 2023
2. World Health Organization. The top 10 causes of death. Available from: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death>. Accessed: 21 Feb 2023
3. Matta, A., Bouisset, F., Lhermusier, T., Campelo-Parada, F., Elbaz, M., Carrié, D., & Roncalli, J. (2020). Coronary artery spasm: New insights. *Journal of Interventional Cardiology*, 2020, 5894586. <https://doi.org/10.1155/2020/5894586>.
4. Bogue, K. A., Idriss, S. F., Sturkey, D., & Derouin, A. (2021). Improving youth sports safety: implementing an emergency action plan for sudden cardiac arrest. *Journal of Pediatric Nursing*, 59, 81–88. <https://doi.org/10.1016/j.pedn.2020.10.001>.
5. Sheehan, J. M., Cloft, H., & Kassell, N. F. (2000). Symptomatic delayed arterial spasm following non-aneurysmal perimesencephalic subarachnoid hemorrhage: a case report and review of the literature. *Acta Neurochirurgica*, 142(6), 709–712. <https://doi.org/10.1007/s007010070117>.
6. Cook D. A. (1995). Mechanisms of cerebral vasospasm in subarachnoid haemorrhage. *Pharmacology & Therapeutics*, 66(2), 259–284. [https://doi.org/10.1016/0163-7258\(94\)00080-m](https://doi.org/10.1016/0163-7258(94)00080-m).
7. Findlay, J. M., Nisar, J., & Darsaut, T. (2016). Cerebral vasospasm: A review. *Canadian Journal of neurological sciences*, 43(1), 15–32. <https://doi.org/10.1017/cjn.2015.288>.
8. Shuck, J. W., Oetgen, W. J., & Tesar, J. T. (1985). Pulmonary vascular response during Raynaud's phenomenon in progressive systemic sclerosis. *The American Journal of Medicine*, 78(2), 221–227. [https://doi.org/10.1016/0002-9343\(85\)90430-9](https://doi.org/10.1016/0002-9343(85)90430-9).
9. Shirao, S., Kashiwagi, S., Sato, M., Miwa, S., Nakao, F., Kurokawa, T., Todoroki-Ikeda, N., Mogami, K., Mizukami, Y., Kuriyama, S., Haze, K., Suzuki, M., & Kobayashi, S. (2002). Sphingosylphosphorylcholine is a novel messenger for Rho-kinase-mediated Ca<sup>2+</sup> sensitization in the bovine cerebral artery: unimportant role for protein kinase C. *Circulation Research*, 91(2), 112–119. <https://doi.org/10.1161/01.res.0000026057.13161.42>.

10. Nakao, F., Kobayashi, S., Mogami, K., Mizukami, Y., Shirao, S., Miwa, S., Todoroki-Ikeda, N., Ito, M., & Matsuzaki, M. (2002). Involvement of Src family protein tyrosine kinases in Ca<sup>2+</sup> sensitization of coronary artery contraction mediated by a sphingosylphosphorylcholine-Rho-kinase pathway. *Circulation Research*, 91(10), 953–960. <https://doi.org/10.1161/01.res.0000042702.04920.bf>
11. Todoroki-Ikeda, N., Mizukami, Y., Mogami, K., Kusuda, T., Yamamoto, K., Miyake, T., Sato, M., Suzuki, S., Yamagata, H., Hokazono, Y., & Kobayashi, S. (2000). Sphingosylphosphorylcholine induces Ca<sup>2+</sup>-sensitization of vascular smooth muscle contraction: possible involvement of rho-kinase. *FEBS Letters*, 482(1-2), 85–90. [https://doi.org/10.1016/s0014-5793\(00\)02046-9](https://doi.org/10.1016/s0014-5793(00)02046-9)
12. Hirano K. (2007). The roles of proteinase-activated receptors in the vascular physiology and pathophysiology. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 27(1), 27–36. <https://doi.org/10.1161/01.ATV.0000251995.73307.2d>
13. Chuapakdee, O., Layangkool, T., & Theerasuwipakorn, N. (2022). Pyridostigmine-induced coronary artery spasm in early-onset myasthenia gravis: a case presentation and review of the literature. *BMJ Case Reports*, 15(9), e249819. <https://doi.org/10.1136/bcr-2022-249819>
14. Daou, B. J., Koduri, S., Thompson, B. G., Chaudhary, N., & Pandey, A. S. (2019). Clinical and experimental aspects of aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *CNS Neuroscience & Therapeutics*, 25(10), 1096–1112. <https://doi.org/10.1111/cns.13222>
15. Spiegel, S., & Milstien, S. (1995). Sphingolipid metabolites: members of a new class of lipid second messengers. *The Journal of Membrane Biology*, 146(3), 225–237. <https://doi.org/10.1007/BF00233943>
16. Jankowich, M., & Choudhary, G. (2020). Endothelin-1 levels and cardiovascular events. *Trends in Cardiovascular Medicine*, 30(1), 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.tcm.2019.01.007>
17. Somlyo, A. P., & Somlyo, A. V. (1994). Signal transduction and regulation in smooth muscle. *Nature*, 372(6503), 231–236. <https://doi.org/10.1038/372231a0>
18. Shimokawa, H., Sunamura, S., & Satoh, K. (2016). RhoA/Rho-Kinase in the cardiovascular system. *Circulation Research*, 118(2), 352–366. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.115.306532>
19. Budzyn, K., Marley, P. D., & Sobey, C. G. (2006). Targeting Rho and Rho-kinase in the treatment

- of cardiovascular disease. *Trends in Pharmacological Sciences*, 27(2), 97–104. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2005.12.002>.
20. Miura, Y., Gotoh, E., Nara, F., Nishijima, M., & Hanada, K. (2004). Hydrolysis of sphingosylphosphocholine by neutral sphingomyelinases. *FEBS Letters*, 557(1-3), 288–292. [https://doi.org/10.1016/s0014-5793\(03\)01523-0](https://doi.org/10.1016/s0014-5793(03)01523-0).
  21. Morikage, N., Kishi, H., Sato, M., Guo, F., Shirao, S., Yano, T., Soma, M., Hamano, K., Esato, K., & Kobayashi, S. (2006). Cholesterol primes vascular smooth muscle to induce Ca<sup>2</sup> sensitization mediated by a sphingosylphosphorylcholine-Rho-kinase pathway: possible role for membrane raft. *Circulation Research*, 99(3), 299–306. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000235877.33682.e9>.
  22. Santini, A., & Novellino, E. (2017). To nutraceuticals and back: Rethinking a concept. *Foods*, 6(9), 74. <https://doi.org/10.3390/foods6090074>.
  23. Stephen L. DeFelice. (1995). The nutraceutical revolution: its impact on food industry R&D. *Trends in Food Science & Technology*, 6(2), 59-61. [https://doi.org/10.1016/S0924-2244\(00\)88944-X](https://doi.org/10.1016/S0924-2244(00)88944-X).
  24. Pieroni, A., Quave, C. L., & Santoro, R. F. (2004). Folk pharmaceutical knowledge in the territory of the Dolomiti Lucane, inland southern Italy. *Journal of Ethnopharmacology*, 95(2-3), 373–384. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2004.08.012>.
  25. Gulati, O. P., & Berry Ottaway, P. (2006). Legislation relating to nutraceuticals in the European Union with a particular focus on botanical-sourced products. *Toxicology*, 221(1), 75–87. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2006.01.014>.
  26. Coppens, P., da Silva, M. F., & Pettman, S. (2006). European regulations on nutraceuticals, dietary supplements and functional foods: a framework based on safety. *Toxicology*, 221(1), 59–74. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2005.12.022>.
  27. Wang, Z., Liu, B., Zhu, J., Wang, D., & Wang, Y. (2019). Nicotine-mediated autophagy of vascular smooth muscle cell accelerates atherosclerosis via nAChRs/ROS/NF-κB signaling pathway. *Atherosclerosis*, 284, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2019.02.008>.
  28. Furmanik, M., Chatrou, M., van Gorp, R., Akbulut, A., Willems, B., Schmidt, H., van Eys, G., Bochaton-Piallat, M. L., Proudfoot, D., Biessen, E., Hedin, U., Perisic, L., Mees, B., Shanahan, C., Reutelingsperger, C., & Schurgers, L. (2020). Reactive oxygen-forming Nox5 links vascular

- smooth muscle cell phenotypic switching and extracellular vesicle-mediated vascular calcification. *Circulation research*, 127(7), 911–927. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.119.316159>.
29. Griendling, K. K., Camargo, L. L., Rios, F. J., Alves-Lopes, R., Montezano, A. C., & Touyz, R. M. (2021). Oxidative stress and hypertension. *Circulation research*, 128(7), 993–1020. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.121.318063>.
  30. Serino, A., & Salazar, G. (2018). Protective role of polyphenols against vascular inflammation, aging and cardiovascular disease. *Nutrients*, 11(1), 53. <https://doi.org/10.3390/nu11010053>.
  31. Yuan, Q., & Zhao, L. (2017). The Mulberry (*Morus alba* L.) fruit—a review of characteristic components and health benefits. *Journal of agricultural and food chemistry*, 65(48), 10383–10394. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b03614>.
  32. Wang, B., & Luo, H. (2021). Effects of mulberry leaf silage on antioxidant and immunomodulatory activity and rumen bacterial community of lambs. *BMC microbiology*, 21(1), 250. <https://doi.org/10.1186/s12866-021-02311-1>.
  33. Song, W., Wang, H. J., Bucheli, P., Zhang, P. F., Wei, D. Z., & Lu, Y. H. (2009). Phytochemical profiles of different mulberry (*Morus* sp.) species from China. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(19), 9133–9140. <https://doi.org/10.1021/jf9022228>.
  34. Khamenei-Tabrizi, A. S., Sendi, J. J., Imaani, S., & Shojaee, M. (2020). Can feeding of silkworm on different mulberry variety affect its performance?. *Journal of Economic Entomology*, 113(1), 281–287. <https://doi.org/10.1093/jec/toz229>.
  35. Meng, Q., Qi, X., Fu, Y., Chen, Q., Cheng, P., Yu, X., Sun, X., Wu, J., Li, W., Zhang, Q., Li, Y., Wang, A., & Bian, H. (2020). Flavonoids extracted from mulberry (*Morus alba* L.) leaf improve skeletal muscle mitochondrial function by activating AMPK in type 2 diabetes. *Journal of Ethnopharmacology*, 248, 112326. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2019.112326>.
  36. Abbasi, A. M., Khan, M. A., Khan, N., & Shah, M. H. (2013). Ethnobotanical survey of medicinally important wild edible fruits species used by tribal communities of Lesser Himalayas-Pakistan. *Journal of Ethnopharmacology*, 148(2), 528–536. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2013.04.050>.
  37. Chan, E. W., Lye, P. Y., & Wong, S. K. (2016). Phytochemistry, pharmacology, and clinical trials of *Morus alba*. *Chinese Journal of Natural Medicines*, 14(1), 17–30.

<https://doi.org/10.3724/SPJ.1009.2016.00017>.

38. Lim, H. J., Jin, H. G., Woo, E. R., Lee, S. K., & Kim, H. P. (2013). The root barks of *Morus alba* and the flavonoid constituents inhibit airway inflammation. *Journal of Ethnopharmacology*, 149(1), 169–175. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2013.06.017>.
39. Leyva-Jiménez, F. J., Ruiz-Malagón, A. J., Molina-Tijeras, J. A., Díez-Echave, P., Vezza, T., Hidalgo-García, L., Lozano-Sánchez, J., Arráez-Román, D., Cenis, J. L., Lozano-Pérez, A. A., Rodríguez-Nogales, A., Segura-Carretero, A., & Gálvez, J. (2020). Comparative study of the antioxidant and anti-inflammatory effects of leaf extracts from four different *Morus alba* genotypes in high fat diet-induced obesity in mice. *Antioxidants*, 9(8), 733. <https://doi.org/10.3390/antiox9080733>.
40. Carrizzo, A., Ambrosio, M., Damato, A., Madonna, M., Storto, M., Capocci, L., Campiglia, P., Sommella, E., Trimarco, V., Rozza, F., Izzo, R., Puca, A. A., & Vecchione, C. (2016). *Morus alba* extract modulates blood pressure homeostasis through eNOS signaling. *Molecular Nutrition & Food Research*, 60(10), 2304–2311. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201600233>.
41. Lee, G. H., Hoang, T. H., Jung, E. S., Jung, S. J., Chae, S. W., & Chae, H. J. (2019). Mulberry extract attenuates endothelial dysfunction through the regulation of uncoupling endothelial nitric oxide synthase in high fat diet rats. *Nutrients*, 11(5), 978. <https://doi.org/10.3390/nu11050978>.
42. Thaipitakwong, T., Numhom, S., & Aramwit, P. (2018). Mulberry leaves and their potential effects against cardiometabolic risks: a review of chemical compositions, biological properties and clinical efficacy. *Pharmaceutical Biology*, 56(1), 109–118. <https://doi.org/10.1080/13880209.2018.1424210>.
43. Shirao, S., Fujisawa, H., Kudo, A., Kurokawa, T., Yoneda, H., Kunitsugu, I., Ogasawara, K., Soma, M., Kobayashi, S., Ogawa, A., & Suzuki, M. (2008). Inhibitory effects of eicosapentaenoic acid on chronic cerebral vasospasm after subarachnoid hemorrhage: possible involvement of a sphingosylphosphorylcholine-rho-kinase pathway. *Cerebrovascular Diseases*, 26(1), 30–37. <https://doi.org/10.1159/000135650>.
44. Zhang, Y., Zhang, M., Lyu, B., Kishi, H., & Kobayashi, S. (2017). Omega-3 and omega-6 DPA equally inhibit the sphingosylphosphorylcholine-induced Ca<sup>2+</sup>-sensitization of vascular smooth muscle contraction via inhibiting Rho-kinase activation and translocation. *Scientific Reports*, 7,

36368. <https://doi.org/10.1038/srep36368>.
45. Asano, N., Oseki, K., Tomioka, E., Kizu, H., & Matsui, K. (1994). *N*-containing sugars from *Morus alba* and their glycosidase inhibitory activities. *Carbohydrate Research*, 259(2), 243–255. [https://doi.org/10.1016/0008-6215\(94\)84060-1](https://doi.org/10.1016/0008-6215(94)84060-1).
46. Marchetti, L., Saviane, A., Montà, A. D., Paglia, G., Pellati, F., Benvenuti, S., Bertelli, D., & Cappellozza, S. (2021). Determination of 1-Deoxynojirimycin (1-DNJ) in leaves of Italian or Italy-adapted cultivars of Mulberry (*Morus* sp.pl.) by HPLC-MS. *Plants*, 10(8), 1553. <https://doi.org/10.3390/plants10081553>.
47. Arai, Y., Watanabe, S., Kimira, M., Shimoi, K., Mochizuki, R., & Kinae, N. (2000). Dietary intakes of flavonols, flavones and isoflavones by Japanese women and the inverse correlation between quercetin intake and plasma LDL cholesterol concentration. *The Journal of Nutrition*, 130(9), 2243–2250. <https://doi.org/10.1093/jn/130.9.2243>.
48. Qiao, Y., Nakayama, J., Ikeuchi, T., Ito, M., Kimura, T., Kojima, K., Takita, T., & Yasukawa, K. (2020). Kinetic analysis of inhibition of  $\alpha$ -glucosidase by leaf powder from *Morus australis* and its component iminosugars. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 84(10), 2149–2156. <https://doi.org/10.1080/09168451.2020.1783991>.
49. Sasaki, M., Nonoshita, Y., Kajiya, T., Atsuchi, N., Kido, M., Chu, D. C., Juneja, L. R., Minami, Y., & Kajiya, K. (2020). Characteristic analysis of trigonelline contained in *Raphanus sativus* Cv. Sakurajima daikon and results from the first trial examining its vasodilator properties in humans. *Nutrients*, 12(6), 1872. <https://doi.org/10.3390/nu12061872>.
50. Ma, Q., Santhanam, R. K., Xue, Z., Guo, Q., Gao, X., & Chen, H. (2018). Effect of different drying methods on the physicochemical properties and antioxidant activities of mulberry leaves polysaccharides. *International Journal of Biological Macromolecules*, 119, 1137–1143. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.08.023>.
51. Je, H. D., Sohn, U. D., & La, H. O. (2016). Endothelium-independent effect of fisetin on the agonist-induced regulation of vascular contractility. *Biomolecules & Therapeutics*, 24(1), 57–61. <https://doi.org/10.4062/biomolther.2015.104>.
52. Deepa, M., Sureshkumar, T., Satheeshkumar, P. K., & Priya, S. (2013). Antioxidant rich *Morus alba* leaf extract induces apoptosis in human colon and breast cancer cells by the downregulation

- of nitric oxide produced by inducible nitric oxide synthase. *Nutrition and Cancer*, 65(2), 305–310. <https://doi.org/10.1080/01635581.2013.748924>.
53. Arraki, K., Totson, P., Attia, R., Zedet, A., Pudlo, M., Messaoud, C., Demougeot, C., & Girard, C. (2020). Arginase inhibitory properties of flavonoid compounds from the leaves of Mulberry (*Morus alba*, Moraceae). *The Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 72(9), 1269–1277. <https://doi.org/10.1111/jphp.13297>.
54. Goud, P. B., & Kachole, M. S. (2012). Antioxidant enzyme changes in neem, pigeonpea and mulberry leaves in two stages of maturity. *Plant Signaling & Behavior*, 7(10), 1258–1262. <https://doi.org/10.4161/psb.21584>.
55. Khalid, S., Malik, A. U., Khan, A. S., Shahid, M., & Shafique, M. (2016). Tree age, fruit size and storage conditions affect levels of ascorbic acid, total phenolic concentrations and total antioxidant activity of 'Kinnow' mandarin juice. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 96(4), 1319–1325. <https://doi.org/10.1002/jsfa.7225>.
56. Meena, N. K., & Asrey, R. (2018). Tree age affects physicochemical, functional quality and storability of Amrapali mango (*Mangifera indica* L.) fruits. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 98(9), 3255–3262. <https://doi.org/10.1002/jsfa.882>.
57. Vukics, V., & Guttman, A. (2010). Structural characterization of flavonoid glycosides by multi-stage mass spectrometry. *Mass Spectrometry Reviews*, 29(1), 1–16. <https://doi.org/10.1002/mas.20212>.
58. Zymone, K., Benetis, R., Trumbeckas, D., Baseviciene, I., & Trumbeckaite, S. (2022). Different effects of quercetin glycosides and quercetin on kidney mitochondrial function–uncoupling, Cytochrome C Reducing and Antioxidant Activity. *Molecules*, 27(19), 6377. <https://doi.org/10.3390/molecules27196377>.
59. Del Rio, D., Rodriguez-Mateos, A., Spencer, J. P., Tognolini, M., Borges, G., & Crozier, A. (2013). Dietary (poly)phenolics in human health: structures, bioavailability, and evidence of protective effects against chronic diseases. *Antioxidants & Redox Signaling*, 18(14), 1818–1892. <https://doi.org/10.1089/ars.2012.4581>.
60. Zhang, H., Hassan, Y. I., Liu, R., Mats, L., Yang, C., Liu, C., & Tsao, R. (2020). Molecular mechanisms underlying the absorption of aglycone and glycosidic flavonoids in a Caco-2 BBe1

- cell model. *ACS Omega*, 5(19), 10782–10793. <https://doi.org/10.1021/acsomega.0c00379>.
61. Huang, M. C., Hsueh, T. Y., Cheng, Y. Y., Lin, L. C., & Tsai, T. H. (2018). Pharmacokinetics and biliary excretion of fisetin in rats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 66(25), 6300–6307. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b00917>.
62. Murota, K., Nakamura, Y., & Uehara, M. (2018). Flavonoid metabolism: the interaction of metabolites and gut microbiota. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 82(4), 600–610. <https://doi.org/10.1080/09168451.2018.1444467>.
63. Dufour, C., & Dangles, O. (2005). Flavonoid–serum albumin complexation: determination of binding constants and binding sites by fluorescence spectroscopy. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1721(1-3), 164–173. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2004.10.013>.
64. Zhang, Y., Xu, Y. Y., Sun, W. J., Zhang, M. H., Zheng, Y. F., Shen, H. M., Yang, J., & Zhu, X. Q. (2016). FBS or BSA inhibits EGCG induced cell death through covalent binding and the reduction of intracellular ROS production. *BioMed Research International*, 2016, 5013409. <https://doi.org/10.1155/2016/5013409>.
65. Saha, S., Panieri, E., Suzen, S., & Saso, L. (2020). The interaction of flavonols with membrane components: Potential effect on antioxidant activity. *The Journal of Membrane Biology*, 253(1), 57–71. <https://doi.org/10.1007/s00232-019-00105-1>.
66. Wu, Y., Huang, X., Yang, H., Zhang, S., Lyu, L., Li, W., & Wu, W. (2023). Analysis of flavonoid-related metabolites in different tissues and fruit developmental stages of blackberry based on metabolome analysis. *Food Research International*, 163, 112313. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2022.112313>.
67. Adebisi, A., Narayanan, D., & Jaggar, J. H. (2011). Caveolin-1 assembles type 1 inositol 1,4,5-trisphosphate receptors and canonical transient receptor potential 3 channels into a functional signaling complex in arterial smooth muscle cells. *The Journal of biological chemistry*, 286(6), 4341–4348. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.179747>.
68. Horii, K., Omi, K., Yoshida, Y., Imai, Y., Sakai, N., Oka, A., Masuda, H., Furuichi, M., Tanimoto, T., & Waga, I. (2010). Development of a sphingosylphosphorylcholine detection system using RNA aptamers. *Molecules*, 15(8), 5742–5755. <https://doi.org/10.3390/molecules15085742>.
69. van IJzendoorn, S. C., Zegers, M. M., Kok, J. W., & Hoekstra, D. (1997). Segregation of

- glucosylceramide and sphingomyelin occurs in the apical to basolateral transcytotic route in HepG2 cells. *Journal of Cell Biology*, 137(2), 347–357. <https://doi.org/10.1083/jcb.137.2.347>.
70. Frick, M., Bright, N. A., Riento, K., Bray, A., Merrified, C., & Nichols, B. J. (2007). Coassembly of flotillins induces formation of membrane microdomains, membrane curvature, and vesicle budding. *Current biology*, 17(13), 1151–1156. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2007.05.078>.
  71. Liu, Z., Silva, J., Shao, A. S., Liang, J., Wallner, M., Shao, X. M., Li, M., & Olsen, R. W. (2021). Flavonoid compounds isolated from Tibetan herbs, binding to GABA<sub>A</sub> receptor with anxiolytic property. *Journal of Ethnopharmacology*, 267, 113630. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2020.113630>.
  72. Devi, S., Rangra, N. K., Rawat, R., Alrobaian, M. M., Alam, A., Singh, R., & Singh, A. (2021). Anti-atherogenic effect of Nepitrin-7-O-glucoside: A flavonoid isolated from *Nepeta hindostana* via acting on PPAR -  $\alpha$  receptor. *Steroids*, 165, 108770. <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2020.108770>.
  73. Verstraeten, S. V., Fraga, C. G., & Oteiza, P. I. (2015). Interactions of flavan-3-ols and procyanidins with membranes: mechanisms and the physiological relevance. *Food & function*, 6(1), 32–41. <https://doi.org/10.1039/c4fo00647j>.
  74. Tarahovsky, Y. S., Kim, Y. A., Yagolnik, E. A., & Muzafarov, E. N. (2014). Flavonoid-membrane interactions: involvement of flavonoid-metal complexes in raft signaling. *Biochimica et biophysica acta*, 1838(5), 1235–1246. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2014.01.021>.
  75. Abdelmoez, A. M., Sardón Puig, L., Smith, J. A. B., Gabriel, B. M., Savikj, M., Dollet, L., Chibalin, A. V., Krook, A., Zierath, J. R., & Pilon, N. J. (2020). Comparative profiling of skeletal muscle models reveals heterogeneity of transcriptome and metabolism. *American journal of physiology. Cell physiology*, 318(3), C615–C626. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00540.2019>.
  76. Shirao, S., Yoneda, H., Shinoyama, M., Sugimoto, K., Koizumi, H., Ishihara, H., Oka, F., Sadahiro, H., Nomura, S., Fujii, M., Tamechika, M., Kagawa, Y., Owada, Y., & Suzuki, M. (2015). A novel trigger for cholesterol-dependent smooth muscle contraction mediated by the sphingosylphosphorylcholine-Rho-kinase pathway in the rat basilar artery: a mechanistic role for lipid rafts. *Journal of cerebral blood flow and metabolism: Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 35(5), 835–842. <https://doi.org/10.1038/jcbfm.2014.260>.
  77. Ruan, B., Zhang, B., Chen, A., Yuan, L., Liang, J., Wang, M., Zhang, Z., Fan, J., Yu, X., Zhang,

- X., Niu, Z., Zheng, Y., Gu, S., Liu, X., Du, H., Wang, J., Hu, X., Gao, L., Chen, Z., Huang, H., Wang, X., & Sun, Q. (2018). Cholesterol inhibits entotic cell-in-cell formation and actomyosin contraction. *Biochemical and biophysical research communications*, 495(1), 1440–1446. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.11.197>.
78. Hissa, B., Oakes, P. W., Pontes, B., Ramírez-San Juan, G., & Gardel, M. L. (2017). Cholesterol depletion impairs contractile machinery in neonatal rat cardiomyocytes. *Scientific reports*, 7, 43764. <https://doi.org/10.1038/srep43764>.
79. Haque, M. Z., McIntosh, V. J., Abou Samra, A. B., Mohammad, R. M., & Lasley, R. D. (2016). Cholesterol depletion alters cardiomyocyte subcellular signaling and increases contractility. *PloS one*, 11(7), e0154151. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0154151>.
80. Nabi, I. R., & Le, P. U. (2003). Caveolae/raft-dependent endocytosis. *Journal of Cell Biology*, 161(4), 673–677. <https://doi.org/10.1083/jcb.200302028>.
81. Fan, W., Guo, J., Gao, B., Zhang, W., Ling, L., Xu, T., Pan, C., Li, L., Chen, S., Wang, H., Zhang, J., & Wang, X. (2019). Flotillin-mediated endocytosis and ALIX-syntenin-1-mediated exocytosis protect the cell membrane from damage caused by necroptosis. *Science Signaling*, 12(583), eaaw3423. <https://doi.org/10.1126/scisignal.aaw3423>.
82. Kok, J. W., Babia, T., Klappe, K., & Hoekstra, D. (1995). Fluorescent, short-chain C<sub>6</sub>-NBD-sphingomyelin, but not C<sub>6</sub>-NBD-glucosylceramide, is subject to extensive degradation in the plasma membrane: implications for signal transduction related to cell differentiation. *Biochemical Journal*, 309 (3), 905–912. <https://doi.org/10.1042/bj3090905>.
83. Ramírez, C. M., Zhang, X., Bandyopadhyay, C., Rotllan, N., Sugiyama, M. G., Aryal, B., Liu, X., He, S., Kraehling, J. R., Ulrich, V., Lin, C. S., Velazquez, H., Lasunción, M. A., Li, G., Suárez, Y., Tellides, G., Swirski, F. K., Lee, W. L., Schwartz, M. A., Sessa, W. C., & Fernández-Hernando, C. (2019). Caveolin-1 regulates atherogenesis by attenuating low-density lipoprotein transcytosis and vascular inflammation independently of endothelial nitric oxide synthase activation. *Circulation*, 140(3), 225–239. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.118.038571>.
84. Zhang, Y., Bi, J., Huang, J., Tang, Y., Du, S., & Li, P. (2020). Exosome: A review of its classification, isolation techniques, storage, diagnostic and targeted therapy applications. *International Journal of Nanomedicine*, 15, 6917–6934. <https://doi.org/10.2147/IJN.S264498>.

85. Meldolesi J. (2018). Exosomes and ectosomes in intercellular communication. *Current Biology*, 28(8), R435–R444. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2018.01.059>.
86. Xiao, M., Huang, M., Huan, W., Dong, J., Xiao, J., Wu, J., Wang, D., & Song, L. (2022). Effects of *Torreya grandis* Kernel oil on lipid metabolism and intestinal flora in C57BL/6J mice. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2022, 4472751. <https://doi.org/10.1155/2022/4472751>.
87. Kirkland, J. L., & Tchkonina, T. (2020). Senolytic drugs: from discovery to translation. *Journal of Internal Medicine*, 288(5), 518–536. <https://doi.org/10.1111/joim.13141>.
88. Wissler Gerdes, E. O., Zhu, Y., Tchkonina, T., & Kirkland, J. L. (2020). Discovery, development, and future application of senolytics: theories and predictions. *The FEBS Journal*, 287(12), 2418–2427. <https://doi.org/10.1111/febs.15264>.