

研究論文

Morinda citrifolia (Noni) fruit juice promotes vascular endothelium function in hypertension via glucagon-like peptide-1 receptor-CaMKK β -AMPK-eNOS pathway (Morinda citrifolia (Noni) フルーツジュースは、グルカゴン様ペプチド-1 受容体-CaMKK β -AMPK-eNOS 経路を介して高血圧の血管内皮機能を促進します)

Hisae Yoshitomi¹ Jingxin Zhou² Toshiaki Nishigaki³ Wei Li⁴ Tonghua Liu⁵
Lili Wu⁵ Ming Gao^{1,6}

- 1: 武庫川女子大学 薬学部 (兵庫県西宮市)
2: 北京中医薬大学付属東志門病院 腎臓内分泌学科 (中華人民共和国 北京市)
3: 株式会社 M&K ラボラトリーズ
4: 東邦大学 薬学部 (千葉県)
5: 北京中医薬大学 (中華人民共和国 北京市)
6: 武庫川女子大学 生物科学研究所 細胞生命分析学科 (兵庫県西宮市)

Correspondence

Ming Gao,

Institute for Biosciences, Mukogawa Women's University, 11-68 Koshien Kyuban-cho, Nishinomiya, Hyogo 663-8179, Japan.

Email: gaoming@mukogawa-u.ac.jp

Lili Wu,

Beijing University of Chinese Medicine, 11 North 3rd-ring East Road, 100029, Chaoyang District, Beijing, People's Republic of China

Email: qingniao_566@163.com

Morinda citrifolia (Noni) は、高血圧を含むさまざまな病気を予防および治療するためのハーブ療法で広く使用されています。この研究の目的は、ノニ果汁の血管への影響を調査し、上流のシグナル伝達経路を特徴づけることでした。収縮期血圧、拡張期血圧、24 時間尿中一酸化窒素 (NO) 代謝物排泄、体重 (BW)、および尿検査を SHR.Cg-Leprcp / NDmcr (SHR / cp) ラットで 6 週間のノニジュース (15ml / kg) 治療後に測定しました。ノニジュースは、血圧や尿量を変えずに、血圧と 24 時間尿中 NO 代謝を有意に低下させました。さらに、ノニジュース抽出物 (NJE) は、ヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) における内皮一酸化窒素シンターゼ (eNOS) のリン酸化の増加を通じて、ラット大動脈輪および NO 産物の内皮血管弛緩を促進しました。NJE は、Ca²⁺ / カルモジュリン依存性プロテインキナーゼ β (CaMKK β) AMPK シグナル伝達を介して、グルカゴン様ペプチド 1 受容体 (GLP-1R) に作用し、HUVEC の抑制剤またはアンタゴニストを前処理する可能性があります。デアセチルアスペルロシド酸 (DAA) は、ノニジュースの活性化化合物であり、HUVEC の同じ経路を介した NO 放出を改善しました。これらの結果は、ノニがおそらく GLP-1R によって誘発される CaMKK β -AMPK-eNOS 経路を調節して内皮依存性弛緩を改善し、したがって血中圧力を低下させる新しい食

用植物であることを示唆しました。

キーワード

GLP-1、高血圧、モリンダシトリフォリア（ノニ）、SHR / cp、血管内皮

1 序章

世界中で 10 億人以上の成人が罹患している高血圧症（NCD-RisC、2017 年）は、心血管イベント、脳卒中、腎障害などの血管疾患のリスクが高まっています（Lewington、Clarke、Qizilbash、Peto、および Collins、2002 年）。血管内皮の NO シンターゼ（eNOS）の内皮型によって合成される一酸化窒素（NO）は、血圧の調節に重要な役割を果たす強力な血管拡張剤です。AMP 活性化プロテインキナーゼ（AMPK）、Akt、およびカモジュリン調節キナーゼ II（CaMK-II）によって媒介される eNOS リン酸化は、高血圧、糖尿病、およびその他の血管疾患で減少することがわかっています（Li、Yon、& Cai、2015）。

グルカゴン様ペプチド-1（GLP-1）は、その受容体であるグルカゴン様ペプチド-1 受容体に結合して活性化することにより、多くの組織におけるグルコース恒常性、胃内容排出、食物摂取、免疫応答、および心臓血管活動を管理するインクレチンホルモンです。（GLP-1R; Graaf et al., 2016）。ファミリーBGPCR の典型的なメンバーである GLP-1R は、その下流のシグナル伝達経路の活性化を通じて GLP-1 および複数のペプチドと相互作用します。血管内皮細胞における GLP-1R の活性化は、プロテインキナーゼ A（PKA）と eNOS を活性化し、NO を放出して、実験モデルの血圧を改善することが実証されています（Chai et al., 2012; Goud、Zhong、Peters、Brook、および Rajagopalan、2016 年）。

ノニとして一般に知られているアカネ科に属するモリンダシトリフォリア L.は、熱帯諸国で育つ常緑樹であり、歴史的な時代からさまざまな病気を治療するための薬草として広く使用されています。ノニフルーツジュースは、抗癌、抗菌、抗ウイルス、抗炎症、抗酸化、降圧、脂質低下、駆虫、鎮痛、免疫増強、肝保護効果など、幅広い生物学的特性を持っていることがわかっています（Ahsan Shueb、Alwar、Shenoy、& Gokul、2016; Mckoy、Thomas、& Simon、2002; Wang et al., 2002）。最近、ノニ果実のエタノール抽出物が、おそらくデキサメタゾン誘発性高血圧ラットのルチンやスコボレチンなどの原因となる化合物を介して血圧を調節することが調査されました（Wigati、Anwar、および Sudarsono、2017 年）。ノニ根の抽出物は、ラット、モルモット、およびウサギの単離された組織において電位依存性カルシウムチャンネルを遮断することによって血圧を管理する能力を示した（Gilani et al., 2010）。

自然発症高血圧 SHR/NDmcr cp（SHR / cp）ラットには、レプチン受容体のナンセンス変異を有するコンジェニック SHR が含まれます。SHR / cp ラットは、肥満、高血糖、脂質異常症、および高インスリン血症を特徴とするメタボリックシンドロームの有用なモデルです（Takaya et al., 1996）。

多くの研究は、高血圧を改善する天然資源とその生物活性化合物の能力を調べました。ノニ果実はこれらの重要な選択肢の 1 つであり、血管拡張機能を備えています。しかし、ノニ果実が *in vivo* または *in vitro* で血圧をどのように調節するかは明らかにされていません。本研究では、メタボリックシンドロームの自然発症高血圧ラットの血管拡張作用に対するノニジュースの効果を調査しました。この研究はまた、ノニ果汁が SHR/cps の血管内皮およびその根底にあるシグナル伝達経路において GLP-1R によって媒介される NO 放出を改善できるという仮説を評価するために行われた。

2 材料と方法

2-1 ノニフルーツジュースとエキス

ノニジュースは東京ノニ研究センターから提供されました。ノニジュース抽出物（NJE）はノニジュースから蒸留されました。

2-2 動物

6週齢の特定病原体除去 SHR/cp ラット (190-210 g) および年齢を一致させたオスのウィスター京都ラット (150-170 g) は、Japan SLC (静岡県) から購入しました。すべてのラットは、12時間の明暗サイクルで温度制御された (温度: 22-24°C、湿度: 40-60%) 光調節された部屋に収容されました。SHR / cp は2つのグループ (n = 7) に分けられました: コントロールグループ (未処理) とノニジュースグループ (15ml / kg / 日)。体重と血圧は2週間ごとに測定されました。6週間の治療期間の終わりに、24時間の尿サンプルが収集されました。次に、動物をイソフルランで麻酔した。大動脈は分析のために液体窒素で直ちに凍結された。すべての手順は、日本生理学会によって確立された生理学の分野における動物の世話と使用の指導原則に従って実施されました。この研究は、武庫川女子大学の実験動物の倫理委員会の下で承認されました (P-06-2015-02-A)。

2-3 血圧測定

収縮期血圧 (SBP) と拡張期血圧 (DBP) は、血圧計 (UR-1000、上田株式会社、千葉) でテールカフ法を用いて測定しました。初期平均 SBP および DBP として、平均 3 回の測定が行われました。

2-4 尿中硝酸塩/亜硝酸塩アッセイ

尿中の硝酸塩および亜硝酸塩 (NO_x) 濃度は、N02 / N03 アッセイキット-FX (Fluorometric; Dojindo, Japan) を使用して測定しました。標準曲線は 0~100 μmol/L の範囲でした。尿サンプルは、96 ウェル Spectra Microplate Autoreader (Sunrise Rainbow; Tecan, Austria) を使用して 560nm で読み取られました。

2-5 血管弛緩測定

大動脈を Wistar ラットから取り出し、すぐに前述のように 37°C で pH7.4 のクレブス溶液 (NaCl 118.4, KCl 4.7, MgSO₄ 1.2, CaCl₂ 2.5, NaHCO₃ 25, KH₂PO₄ 1.2, およびグルコース 11.1 in mM) で満たされたワイヤーまたは圧力ミオグラフィシステムに配置しました (Wu et al., 2016)。内膜表面を綿棒で軽くこすることにより、内皮を除去した。フェニレフリン収縮中のアセチルコリンに対する弛緩反応の消失により、内皮の除去が確認された。内皮の有無にかかわらず、リングは 3 μmol / L のフェニレフリンで収縮し、最大収縮の約 80% に達しました。安定した収縮が得られた後、NJE (1-8mg / ml) を浴に加えた。一部の動脈は、NOS 抑制剤 NG・ニトロ-L-アルギニンメチルエステル (L-NAME、300 μM、30 分) または GLP-1 拮抗薬エキセンデイン 9-39 (100 nM、30 分) で前処理されました。弛緩反応は、100 μM パパベリンによる最大弛緩のパーセンテージとして示されました (P-06-2017-02-A)。

2-6 細胞培養と治療

ヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) は、内皮細胞基礎培地 2 (Promo Cell、ドイツ) で培養されました。細胞は、37°C で 5% CO₂ を含む加湿インキュベーターで増殖させました。80% のコンフルエンスの後、細胞を NJE で処理しました。NJE で処理された HUVEC の細胞生存率は MTT アッセイによって評価されました。細胞を NJE 治療前に抑制剤またはアンタゴニスト、100 μM L-NAME、40 μM EX527、1 μM ペリホシン、10 μM H89、10 μM ST0609、10 μM BAPTA-AM、10 μM 化合物 C、10 nM Exendin9-39 で 30 分間前処理しました。

2-7 細胞内 NO 産生の測定

NO 産生は、特定の NO プローブである 4-アミノ-5-メチルアミノ-2', 7'-ジフルオロフルオレセインジアセテート (DAF-FM DA) の蛍光を測定することによって推定されました (Molecular Probes, Inc.; Li et al., 2008)。HUVEC は、NJE (0.1-1 mg / ml) を含む PBS 中の 10 μM DAF-FM DA とともに、37°C で 1 時間イ

ンキュベートしました。PBSで洗浄した後、細胞を100 μ ML-アルギニンを含むハックス溶液に交換しました。蛍光強度は、485nmの励起と515nmの発光で3時間モニターされました。

2-8 細胞内 Ca^{2+} レベルの決定

細胞内カルシウムレベルは、細胞内カルシウムインジケータFluo-4-AMを使用して調べた。合流時にNJE (2 mg / ml) で治療されたHUVEC。細胞に5 μ M 蛍光色素Fluo-4-AMを37°Cで1時間ロードしました。次に、記録媒体 (HEPES 20、NaCl 115、KCl 5.4、MgCl₂ 0.8、CaCl₂ 1.8、グルコース 13.8 in mM、pH 7.4) を交換し、蛍光を測定しました (Ex : 485 nm、Em : 530 nm)。定常状態を確保するためにバックグラウンド読み取りを5~10分間行った後、NJEを追加しました。カルシウムレベルは7秒ごとに追跡され続けました。

2-9 一次および二次抗体

免疫ブロッティングは、次の市販の抗体を使用して実行されました : Akt、phospho-Akt、AMPK、phospho-AMPK、eNOS、phospho-eNOS、phospho-LKB1、anti-rabbit IgG、およびCell Signaling Technology (Beverly、MA)。 β -アクチンはSigma (St. Louis、MO) から入手しました。

2-10 ウェスタンブロッティング

細胞および組織は、50 mM Tris-HCl (pH 7.4)、100 mM NaCl、1%Nonidet- P40、0.25%デオキシコール酸ナトリウム、0.1%ドデシル硫酸ナトリウム、1 mM エチレンジアミン四酢酸、50mM フッ化ナトリウム、2 mM オルトバナジン酸イオン、30 mM ピロリン酸ナトリウム、2 mM フェニルメタンスルホンフルオリド、1 mM ベンザミジン、0.02 g / ml トリプシン抑制剤、0.02 g / ml ロイペプチン、および0.02 g/ml アプロチニンを含む氷冷ホモジナイゼーションバッファーでタンパク質を抽出しました。タンパク質濃度は、タンパク質アッセイキット (Bio-Rad) を使用して測定しました。タンパク質をポリフッ化ビニリデンメンブレン (Amersham Life Science、Inc.、Buckinghamshire、UK) に転写し、適切な抗体とハイブリダイズさせました。バンドは、NIHImageを使用して定量化およびスキャンされました。内部対照として β -アクチンを使用しました。

2-11 LC-PDA-ESI-MS によるノニ果汁中の化学成分の分析

ノニジュースをメンブレンフィルター (0.45 μ m) でろ過し、サンプル溶液を得ました。次に、サンプル中の化学成分をLCMS-8040 トリプル四重極 LC / MS/MS 質量分析計で分析しました。YMC-Triart C18 カラム (3.0 mm、150 x 2.1mm) を使用したLC研究では、35° Cでした。流量は0.2ml/ min、注入量は2 μ l でした。移動相は、A (水溶液中の0.1%ギ酸) とB (アセトニトリル中の0.1%ギ酸) で構成されました。グラジエント溶出は0~3分、5%B ; 3~10分、5~10%B ; 10~30分 10~40%B ; 30~40分、40~100%B ; 40~50分、100%B でした。質量分析計は、m / z 100~1,600 の範囲の正イオンモードと負イオンモードの両方で操作されました。乾燥温度は350°Cに設定され、乾燥ガス流量は15L/min でした。界面電圧は陽イオンモードで4.5kV、負イオンモードで-3.5 kV に設定され、衝突電圧は15V に設定されました。PDA 検出器は、UV 条件で190~400nm に設定されました。

2-12 統計分析

データは、3回の独立した実験の平均の平均士標準誤差 (SEM) として表されました。データの統計分析は、一元配置分散分析とそれに続くダネット検定またはテューキー検定を使用して実行され、差異の有意性が決定されました。次に、血管弛緩曲線を分析して、EC₅₀ (最大阻害濃度の半分) を決定しました。曲線のデータは、非線形回帰法 (GraphPad Prism 8) によるトルコの検定で計算されました。p 値<.05 は統計的に有意であると見なされました。

3 結果

3-1 SHR/cp ラットにおけるノニジュース投与の *invivo* 効果

私たちの最初の目的は、ノニジュースの血圧への影響が経口投与によって引き起こされるかどうかを調査することでした。私たちのデータは、ノニジュースで治療された SHR / cp ラットが、2 週間の経口投与後に収縮期および拡張期血圧の上昇の有意な抑制を示したことを示しています (図 1a)。ただし、対照群とノニ群の間で体重、インスリン、ブドウ糖に有意差はありません (図 1b)。さらに、ノニ群の 24 時間尿中 NO 代謝物 (硝酸塩および亜硝酸塩) 排泄量は、対照群の 3 倍でした (図 1c)。血管内皮の重要な機能は、eNOS 由来の NO を

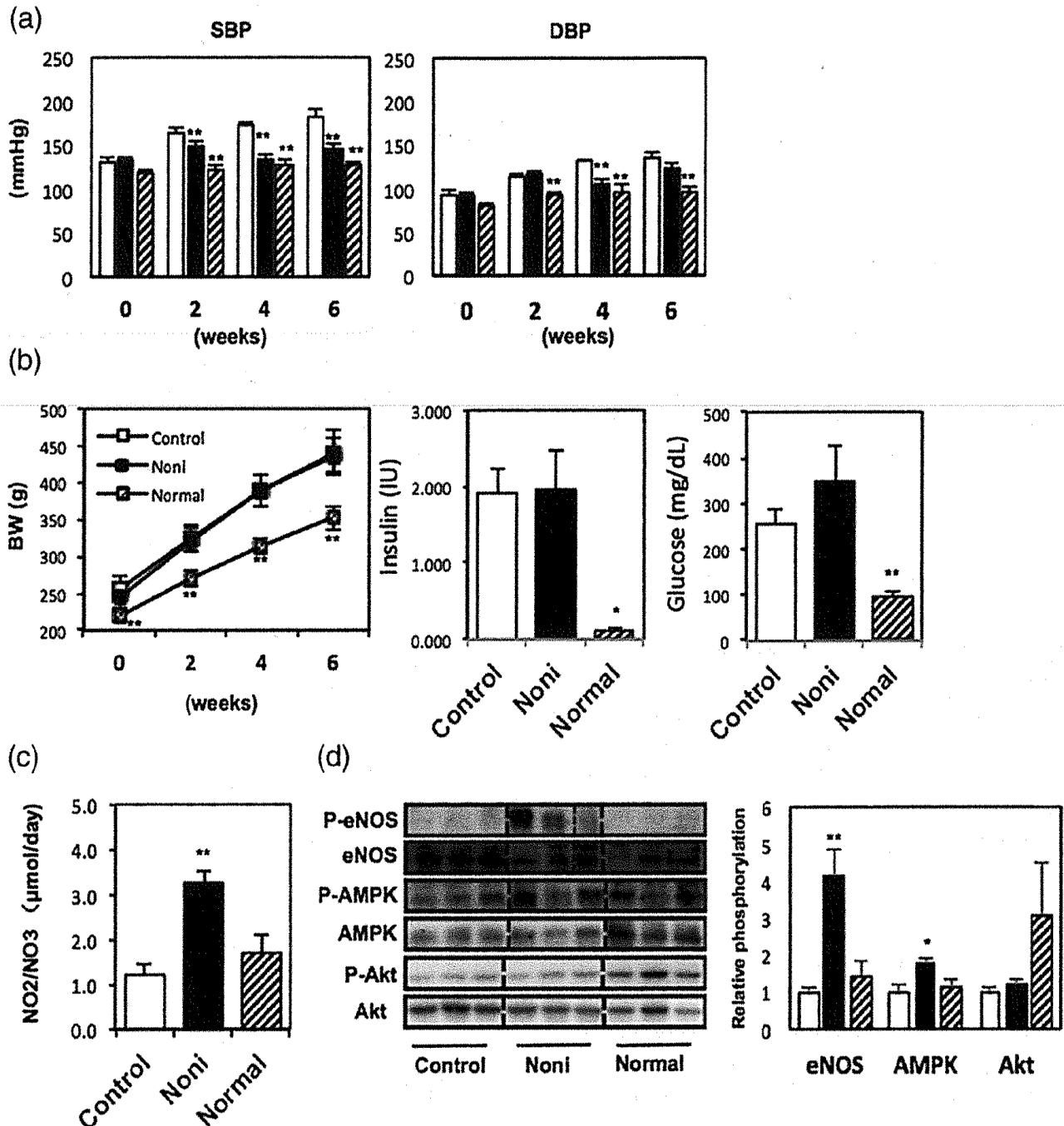


図 1 SHRCP ラットの血圧と NO に対するノニジュース (15ml / kg / 日、経口) の効果。(a) 収縮期および拡張期血圧は、ノニジュースまたはビヒクルを含む SHRCP ラット、および年齢を一致させた Wistar Motorcycle (WKY) ラットで 2 週間ごとに検出されました。(b) 体重は SHRCP ラットと WKY ラットで 2 週間ごとに測定され、インスリンとグルコースは 6 週間の治療の終わりに測定されました。(c) SHRCP ラットおよび WKY ラットの尿を用いて、560 nm での光学密度 (OD) 値により、24 時間の尿中 NO 代謝物 (硝酸塩および亜硝酸塩) の排泄を分析した。(d) ノニジュースまたはビヒクルを含む SHRCP ラットおよび WKY ラットのラット大動脈を、リン酸化 eNOS、AMPKa、および Akt、総 eNOS、AMPK α 、および Akt に対する抗体を用いたウエスタンブロット分析に供した。値は平均 $\pm$ SE/vi (n = 7)、* p < .05 として表されます。 **対照群と比較して p < .01

生成して血管の緊張を制御することです (Yang et al., 2015)。したがって、ラット大動脈を使用して、eNOS 活性およびその上流因子に対するノニジュース投与の効果を調べた。図 1d に示すように、ノニジュースグループの Ser1177 での eNOS のリン酸化レベルは、コントロールグループよりも有意に高かった。その後、eNOS の上流キナーゼである AMPK と Akt のリン酸化が調査されました (Fleming & Busse, 2003)。ノニ治療は、対照群と比較して、AMPK のリン酸化を有意に増加させました。ただし、Akt は 2 つのグループでリン酸化レベルの違いを示しませんでした。表 51 に示すように、対照群とノニ群の間の尿量にも違いはありませんでした。

3-2 NJE は、Wistar ラット大動脈において GLP-1R を介して内皮型一酸化窒素血管弛緩を誘発します

NJE が血管機能を直接調節するかどうかを判断するために、Wistar ラット大動脈を用いて血管弛緩を行いました。私たちのデータは、NJE の増加用量の投与が大動脈の血管弛緩を引き起こし、それが内皮除去によって廃止されたことを示しました (図 2a)。内皮を伴う NJE に対する血管弛緩反応の EC50 値は、内皮を伴わない NJE よりも有意に低かった (内皮を伴う場合、 3.34 ± 0.49 mg / ml; 内皮を伴わない場合、 5.40 ± 0.44 mg / ml、 $p < .05$)。同様に、eNOS 抑制剤 L-NAME は、NJE によって刺激された血管弛緩を抑制しました (図 2b)。NJE に対する血管弛緩反応の EC50 値は、L-NAME の場合よりも有意に小さかった (NJE、 3.34 ± 0.49 mg / ml; L-NAME の NJE、 4.85 ± 0.53 mg / ml、 $p < .05$)。

3-3 NJE は HUVEC の NO 産生と AMPK/eNOS 活性を増加させます

血管弛緩に関連する NO 放出に対する NJE の効果を検証するために、DAF-FMDA を使用して内皮細胞からの NO 産生を実行しました。図 2c に示すように、NJE 処理 ($0.1-1$ mg / ml) は、対照群と比較して、HUVEC における NO 産生の蛍光レベルの反射を有意に増加させました。eNOS リン酸化は、NJE 治療後 15 分で有意に上昇しました。eNOS と同じ方法で、NJE は AMPK リン酸化を急速に増加させましたが、NJE 処理は Akt リン酸化を変化させませんでした (図 2d)。図 2、f に示すように、NO 産生に対する NJE の効果は、eNOS 抑制剤 L-NAME と AMPK 抑制剤化合物 C によって同様に逆転しました。しかし、Akt 抑制剤ペリホシンは機能しませんでした (図 2g)。

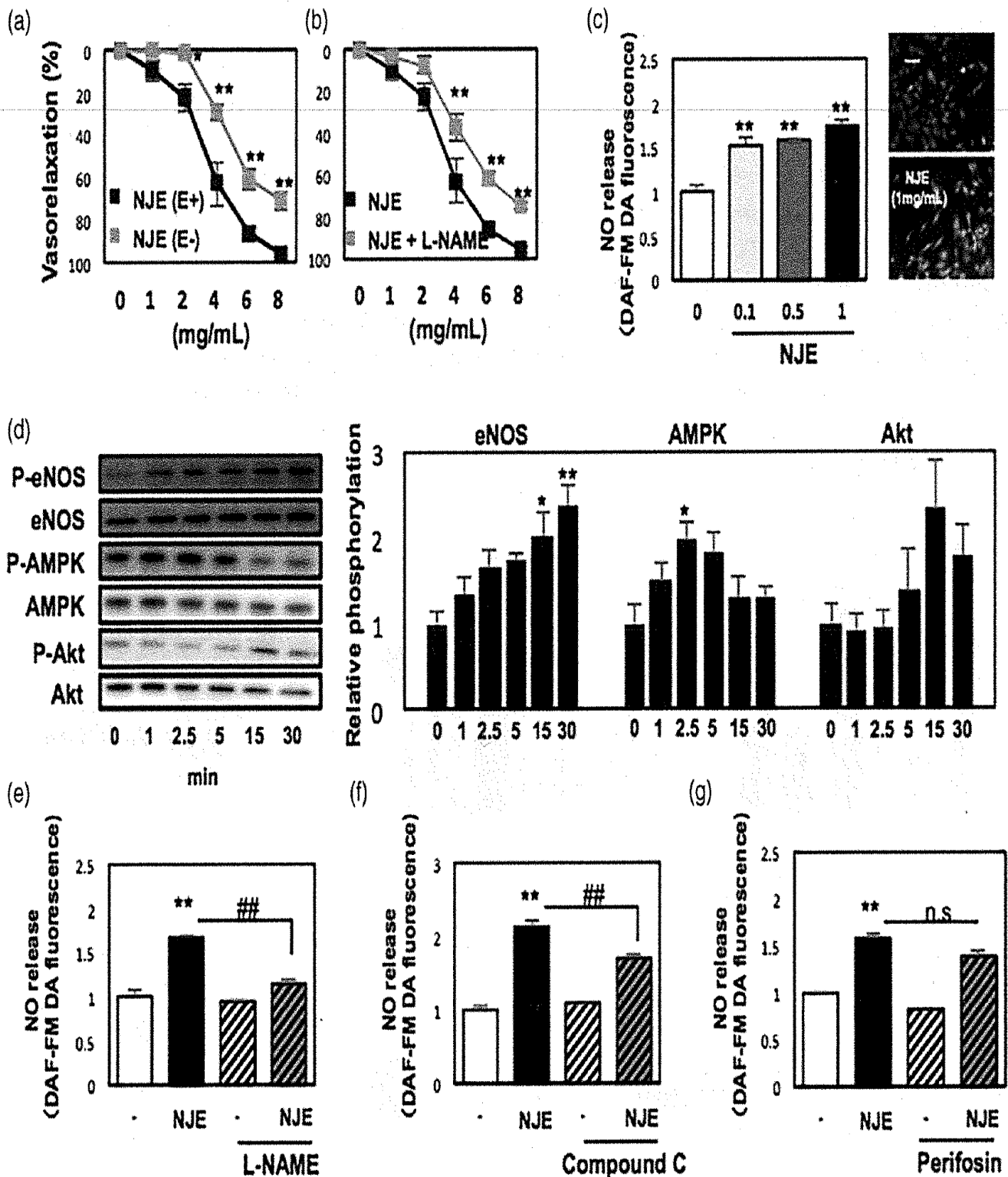


図2 NJEは、Wistarラット大動脈で内皮型一酸化窒素血管弛緩を誘発し、HUVECでのNO産生を増加させます。(a) NJE (1-8 mg/ml)を浴に加え、内皮の有無にかかわらずWistarラット大動脈リングを3 μ mol/Lフェニレフリンで収縮させ、血管弛緩測定のための安定した収縮を達成しました。(b) 一部の動脈は、NOS抑制剤NG-ニトロ-L-アルギニンメチルエステル(L-NAME、300 μ M、30分)とのプレインキュベーションの非存在下または存在下でNJE (1-8 mg/ml)で処理されました。値は平均土SEM (n = 5-7)として表されます。(c) HUVECでNJE処理 (0.1-1 mg/ml)を行ったDAF-FM DAの蛍光を測定することにより、NO産生を推定しました。(d) 細胞を様々な時間のNJE処理でインキュベートした。全細胞溶解物を、HUVEC中のリン酸化eNOS、AMPK α 、およびAkt、全eNOS、AMPK α 、およびAktに対する抗体を用いたウェスタンブロット分析に供した。(e、f、およびg) eNOS抑制剤L-NAME、AMPK抑制剤化合物CおよびAkt抑制剤ペリホシンで前処理した後、NJE (1 mg/ml)と1時間インキュベートしたHUVECからのNO産生を行いました。値は平均土SEM (n = 3)として示されています。* p < .05; ** p < .01 対照群と比較。DAF-FM DA、4-アミノ-5-エチルアミノ-2', 7'-ジフルオロフルオレセインジアセテート; HUVEC、ヒト臍帯静脈内皮細胞; NJE、ノニジュース抽出物; いえ、一酸化窒素[色の図はwileyonlinelibrary.comで見ることができます]

3-4 カルシウム-カルモジュリンシグナル伝達は、NJE によって引き起こされる NO 産生に不可欠です

NJE 処理によって AMPK がどのように活性化されるかをさらに解明するために、AMPK の上流因子である Ca^{2+} /カルノデュリン依存性プロテインキナーゼ β (CaMKK β)、サイレント情報レギュレーター1 (Sirt1) および肝臓キナーゼ B1 (LKB1) の潜在的な関与を調査しました。HUVEC で CaMKK β 抑制剤 STO609 とインキュベートすると、NJE は NO 産生を増加させることができませんでした (図 3a)、Sirt1 抑制剤 EX527 は NJE 誘導 NO 産生を抑制せず、LKB1 リン酸化は NJE 治療の時間経過に違いを示しませんでした (図 3b、c)。CaMKK β と eNOS は、細胞内 Ca によって調節される酵素です (Michel & Vanhoutte, 2010; Swulius & Waxham, 2008)。私たちの研究では、細胞間 Ca レベルは蛍光プローブ Fluo-4AM によって決定されました。NJE は細胞内 Ca レベルを大幅に増加させる可能性があります (図 3d)。さらに、HWEC と Ca キレート剤 BAPTA-AM、NJE とのインキュベーションでは、NO 産生を増加させることができませんでした (図 3e)。これは、NJE がカルシウム-カルモジュリンシグナル伝達を刺激し、NO 産生を誘発することを示唆しています。

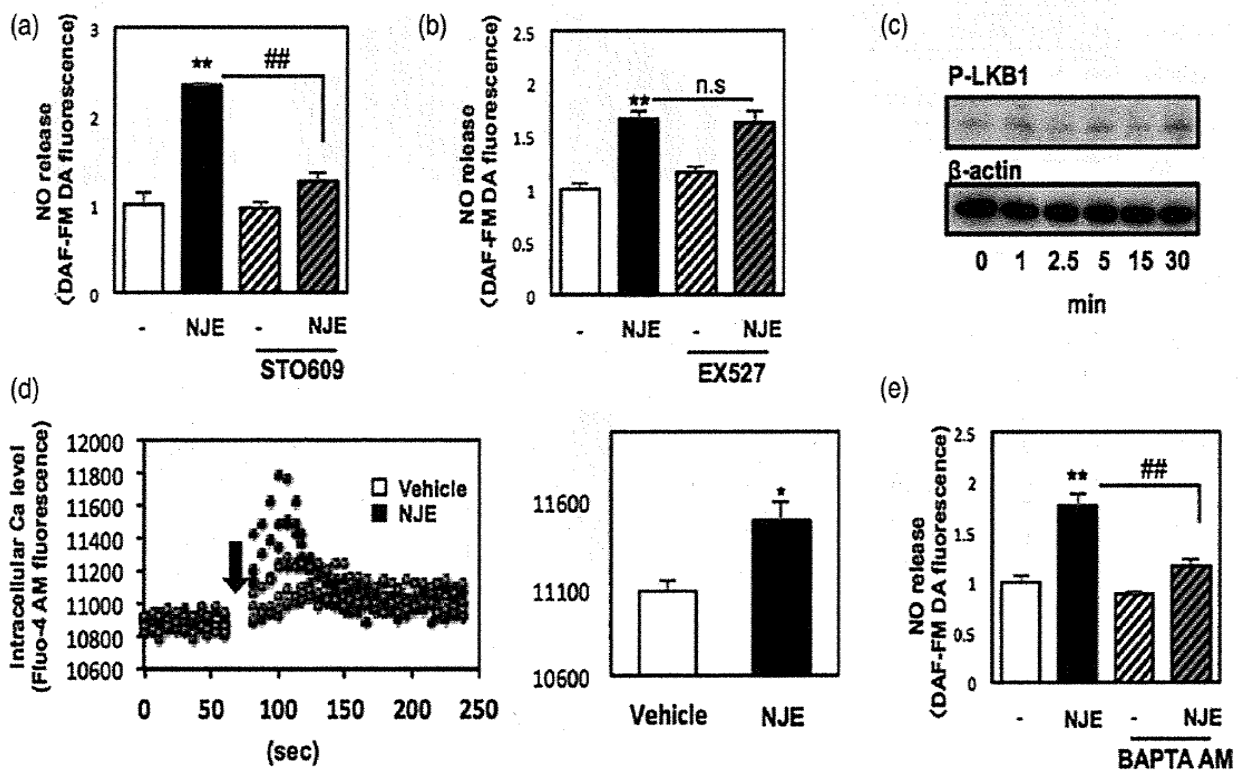


図3 CaMKK β シグナル伝達経路は、HUVEC における NO 産生に対する NJE の影響に関与していた。(a および b) HUVEC を CaMKK β 抑制剤 STO609 (10 μM , 30 分) および Sirt1 抑制剤 EX527 (40 μM , 30 分) で前処理した後、NJE (1 mg / ml) で 1 時間処理しました。(a) NJE による NO 産生は STO609 によって抑制された。(b) EX527 は NJE によって誘発された NO 産生に影響を与えませんでした。(c) NJE 処理の時間経過に伴うリン酸化 LKB1 がウエスタンブロット分析によって検出された。(d) NJE (2 mg / ml) で処理した HUVEC の細胞内カルシウムレベルを、5 μM の蛍光色素 Fluo-4-AM を使用して蛍光下で調べました (例: 485 nm、Em: 530 nm)。(e) HUVEC での NJE 処理による NO 産生は、10 μM BAPTA-AM インキュベーションによって減少しました。結果は平均 $\pm$ SEM (n = 3) として表されます。* p < .05; ** p < .01 対照群と比較。## p < .01 STO609 の有無にかかわらず NJE と BAPTAAM の間。CaMKK β 、Ca $^{2+}$ =カルモジュリン依存性プロテインキナーゼキナーゼ β ; HUVEC=ヒト臍帯静脈内皮細胞; NJE=ノニジュース抽出物; NO=一酸化窒素

3-5 NJE 調節 NO 産生は、GLP-1 受容体と PKA によって媒介されます

一部の酵素はカルシウム-カルモジュリン経路の調節因子として知られていますが、GLP-1R/PKA は関与する要因の 1 つです。最初に、NJE で強化された NO 産生が GLP-1R によって媒介されるかどうかを調べました。予測されたように、NJE によって誘発された NO 産生は、HUVEC の GLP-1R アンタゴニストであるエキセンディン 9-39 によってブロックされました (図 4a)。次に、カルシウム-カルモジュリン経路に対するエキセンディン 9-39 の抑制効果を実行しました。図 4b、c のように、エキセンディン 9-39 は、AMPK のリン酸化と NJE で処理された細胞間 Ca レベルを大幅に低下させました。さらに、エキセンディン 9-39 は、ラット大動脈で NJE によって刺激された血管弛緩を抑制しました (図 4d)。NJE に対する血管弛緩反応の EC50 値は、エキセンディン 9-39 の場合よりも有意に小さかった (NJE=3.82 ± 0.28 mg / ml ;エキセンディン 9-39 の NJE=4.67 ± 0.25 mg / ml、p<.05)。PKA 抑制剤 H89 の前処理により、NJE グループの NO 産生と細胞間 Ca レベルも減少しました (図 4e、f)。

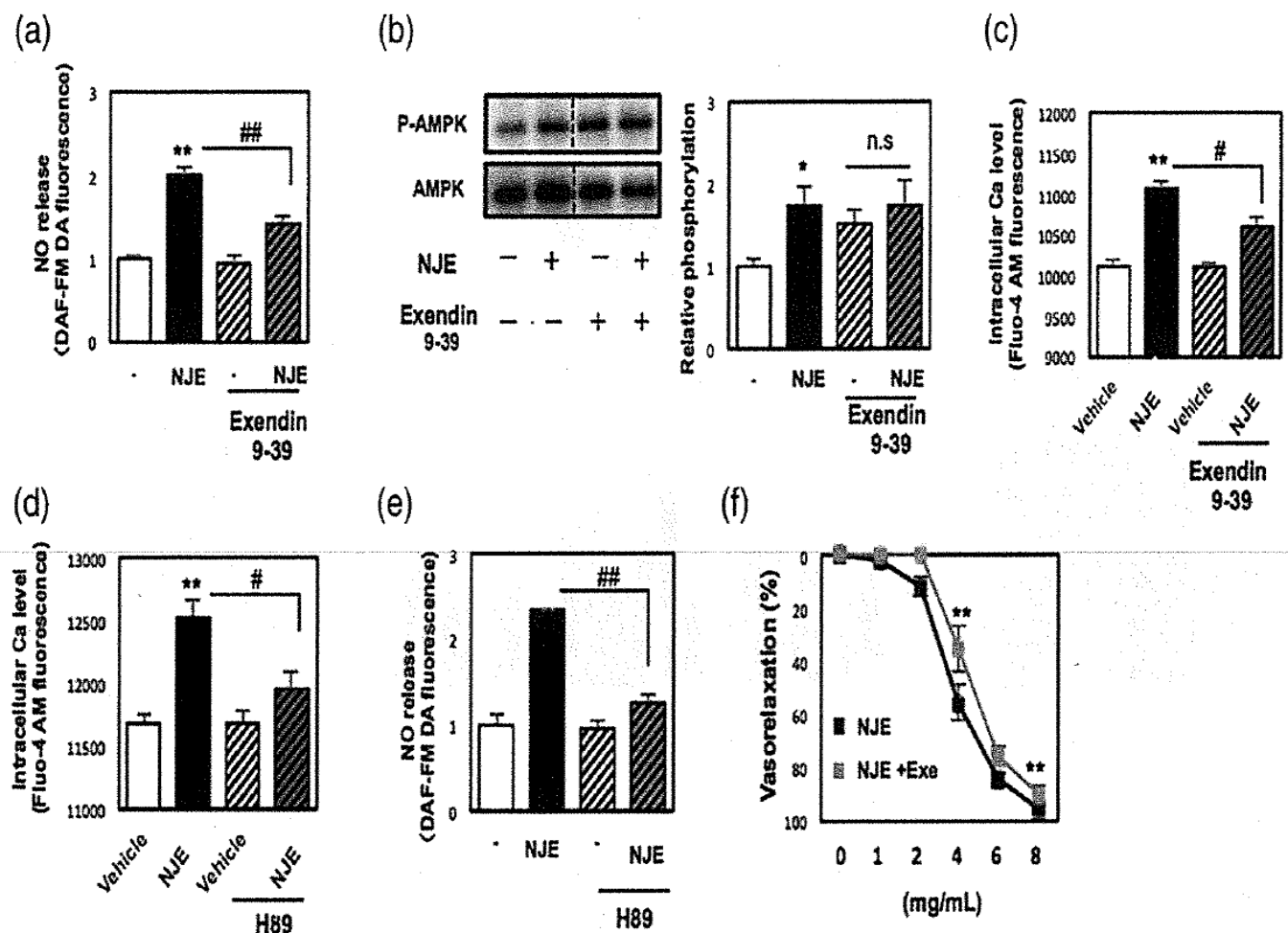


図 4 GLP-1R アンタゴニストおよび PKA 抑制剤は、HUVEC における NJE を介した NO 産生を減少させました。HUVEC は、NJE 処理の前に、GLP-1R アンタゴニストである Exendine 9-39 (10 nM、30 分) または PKA 抑制剤 H89 (10 μM、30 分) の前処理とともにインキュベートされました。(a) Exendine 9-39 は、NJE によって処理された NO 生成をブロックしました。(b) AMPK 発現のリン酸化は、Exendine 9-39 の前処理で NJE とビヒクルの間で異ならなかった。(c) Exendine 9-39 および (d) H89 は、NJE によって誘発された細胞内 Ca レベルを予約しました。(e) NJE を介した NO 産生は H89 によって減少した。データは平均 ± SEM (n = 3) として表されます。(f) Exendine 9-39 は、Wistar ラット大動脈輪の NJE 治療 (1-8 mg / ml) で血管収縮を減少させました。データは平均 ± SEM (n = 7) として表されます。* p <.05; ** p <.01 車両と NJE の間、# p <.05; ## p <.01 Exendine 9-39 または H89 の有無にかかわらず NJE 間、n.s 車両と Exendine9-39 を使用した NJE 間。HUVEC=ヒト臍帯静脈内皮細胞; NJE=ノニジュース抽出物; NO=一酸化窒素; PKA=プロテインキナーゼ A

3-6 デアセチルアスペルロシド酸はノニジュースの有効成分です

LC-MS 分析により、ノニジュース中の 7 つの化合物、すなわち、アスペルロシド酸、デアセチルアスペルロシド酸、スコポレチン、モリンドリン、および 3 つの脂肪酸配糖体が同定されました。NO に対する化合物の細胞効果を評価した結果、主要化合物であるデアセチルアスペルロシド酸 (DAA、100、200ug / ml) の濃度が NO 放出を依存的に増加させました (図 5b)。DAA は eNOS と AMPK のリン酸化を改善しましたが、NJE と一致して Akt は改善しませんでした (図 5c)。eNOS、AMPK、および CaMKK β の抑制剤で前処理すると、NO 放出に対する DAA の効果は HUVEC では無効になりました (図 5d、e、f)。NJE によると、DAA によって誘発される NO 放出は、GLP-1R アンタゴニストと Ca キレート剤によって減少しました (図 5g、h)。

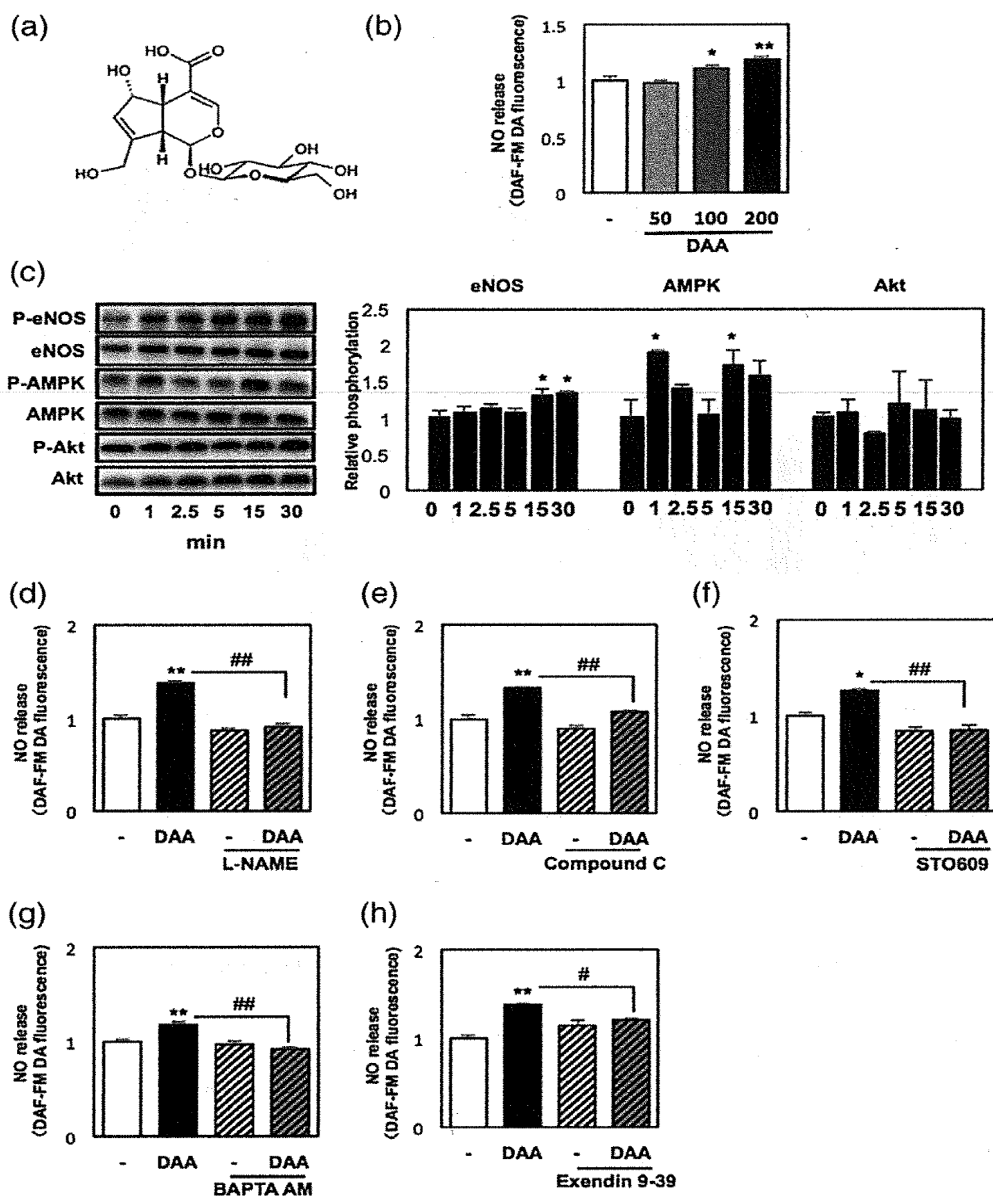


図 5 DAA はノニジュースの有効成分です。(a) DAA の構造。

(b) 異なる濃度の DAA (50、100、200 ug / ml) が NO 放出に及ぼす影響を、示されているように評価しました。(c) リン酸化 eNOS、AMPK、および Akt に対する抗体を用いたウェスタンブロット分析、DAA 処理後の総 eNOS、AMPK、および Akt が HUVEC で検出されました。(d-h)、L-NAME、化合物 C、STO609、BAPTAAM、および Exendine 9-39 で前処理し、DAA (200 ug / ml) とインキュベートした HUVEC からの NO 産生を測定しました。値は平均 $\pm$ SEM (n=3) として示されています。

(b および c) *p<.05; **p<.01 対照群と比較。(d-h) **p<.01 DAA と対照群の間、# p<.05; #p<.01 抑制剤または拮抗剤の有無にかかわらず DAA 間。

HUVEC=ヒト臍帯静脈内皮細胞;
DAA=デアセチルアスペルロシド酸;

NO=一酸化窒素

討論

高血圧の病因は、内皮機能障害や酸化などの経路を介した血管の構造と機能の変化に起因します (Higashi, Kihara, & Noma, 2012)。以前に報告されたように、内皮異常は高血圧における NO の利用可能性の減少に関連しています (Schulz, Jansen, Wenzel, Daiber, および Munzel, 2008 年)。NO は、本態性高血圧症の患者で血管拡張の障害が観察されている一方で、ヒトの動脈の血管弛緩を媒介する上で重要な役割を果たしています (Li, Youn, & Cai, 2015)。さらに、eNOS 遺伝子の欠失または NO 合成の慢性的な抑制は、動物モデルにおける高血圧の発症に起因します (Hermann, Flammer, & Lüscher, 2006)。

ノニは、さまざまな病気を治療するための薬草として広く使用されている一般的な植物です。以前の研究では、ノニ果実は、水生生物としての動物モデルで優れた抗酸化能力 (Yang, Gadi, & Thomson, 2011) と低血圧活性を示しました (Shenoy et al., 2011)。本研究は、ノニジュースが SHR / cp ラットの血液圧を改善し、その抽出物 NJE がラット大動脈輪の血管拡張を媒介したことを示しています。メタボリックシンドロームモデルを伴う自然発症高血圧として SHR/cp ラットを使用して、ノニフルーツジュースが BW、ブドウ糖、インスリン、および尿量、タンパク質、電解質などを変化させることなく、収縮期血圧と拡張期血圧の両方を低下させることができることを調査しました。これは、ノニジュースの降圧効果が、私たちの研究における利尿またはインスリン抵抗性の改善とは関係がないことを示唆しています。ノニジュースは、SHR / cp ラット大動脈における eNOS の NO 代謝物排泄とリン酸化発現を改善し、NJE は HUVEC 内皮細胞における NO 産生を刺激しました。したがって、それは、ノニジュースが血管内皮の eNOS 由来の NO を生成することによって潜在的に血圧を媒介することを示しています。Ser615、633、および 1,177 でのリン酸化による eNOS 活性の調節は、十分に確立されています (Fleming, Fisslthaler, Dimmeler, Kemp, および Busse, 2001; Garcia-Cardena, Fan, Stern, Liu, および Sessa, 1996; Kolluru, Siamwala, & Chatterjee, 2010; Michell et al., 2001)。AMPK、Akt、ERK1 / 2、CaMK- $\parallel$ などのキナーゼは、Ser1177 での eNOS リン酸化に関与していることが示されています (Cai, Liu & Garcia, 2008; Fulton et al., 1999; Nguyen & Cai, 2006; Youn, Wang, & Cai, 2009)。本研究では、ノニジュースで処理した AMPK と eNOS のリン酸化が SHR / cp ラットモデルと HUVEC で有意に増加したのに対し、Akt のリン酸化はノニ群と対照群で差がなかったことを発見しました。eNOS のリン酸化と活性化につながる AMPK は、血管内皮細胞における NO 産生と血管拡張効果を増強することが報告されています (Chen et al., 2009; Kanazawa, Yamaguchi, Yano, Yamauchi, & Sugimoto, 2008; Li et al., 2008)。興味深いことに、本研究の結果は、AMPK および eNOS 抑制剤が AMPK / eNOS のリン酸化、HUVEC での NO 産生、および NJE によって引き起こされるラット大動脈での血管弛緩を抑制したことを示しています。これは、NJE が AMPK / eNOS の新規調節因子であり、血管内皮細胞での NO 産生を仲介する可能性があることを示唆しています。

LKB1、Sirt1、および CaMK β は、内皮細胞における AMPK 活性化の上流キナーゼです (Fisslthaler & Fleming, 2009; Sanz, 2008)。私たちの研究では、LKB1 のリン酸化と Sirt1 抑制剤 EX527 による NO 産生を検出することにより、NJE がヒト内皮細胞の LKB1 と Sirt1 に影響を与えないことが示されました。ただし、NJE は HUVEC の細胞内 Ca レベルを改善しました。Ca レベルが CaMKK β を調節するので、NJE によって誘発される NO 産生はそれぞれ CaMKK β 抑制剤 ST0609 と Ca キレート剤 BAPTAAM によって備蓄されていることがわかりました。多くの研究が、CaMKK β が細胞内 Ca²⁺ の増加を下流の標的 AMPK リン酸化に変換して、内皮機能の維持を維持し、AMPK リン酸化を介して強力な eNOS 活性化因子になることを報告しています (Fisslthaler & Fleming, 2009; Woods et al., 2005)。これらの観察結果は、NJE がカルシウム-カルモジュリンシグナル伝達を刺激し、HUVEC で AMPK を介して NO 産生を誘発することを裏付けています。

N 末端シグナルペプチドとさまざまなグリコシル化部位を含む 463 残基の糖タンパク質である GLP-1R は、多くの組織で発現するインクレチン軸を介して GLP-1 の作用を調節します。GLP-1R は、損傷の軽減やブドウ糖代謝の改善などの心臓保護作用があると考えられています (Graaf et al., 2016)。Liu et al (2012) は、GLP-1R の発現が SHR 腎動脈で減少したのに対し、DPP-4 抑制シタグリプチンは GLP-1R の発現を回復し、遺伝性高

血圧モデル SHR 動脈の内皮機能を軽減したことを示しました。GLP1-1R は、ヒト冠状動脈内皮細胞で発現することが報告されており (Nystrom et al., 2004)、蛍光抗体法およびウエスタンブロット分析を介してこの抗体を使用して検出された HUVEC でも発現します (Ke et al., 2017)。本研究では、GLP-1R アンタゴニストであるエキセンディン 9-39 が NJE を介した NO 産生をブロックしました。いくつかの研究はまた、血管内皮に対する GLP-1 の作用における GLP-1R および cAMP の役割を示唆しました (Kieffer & Habener, 1999)。GLP-1R の活性化には、cAMP 依存性 PKA が関与していると見なされています (Graaf et al., 2016)。PKA は、心房筋の Ca ホメオスタシスの活性化を仲介します (Fischer et al., 2015)。さらに、PKA は invitro および海馬スライスで CaMKK のリン酸化を調節することができます (Matsushita & Nairn, 1999)。私たちの調査結果は、エキセンディン 9-39 または PKA 抑制剤 H89 が、NO 産生、AMPK のリン酸化、および細胞間 Ca レベルに対する NJE の効果を減少させたことを示しています。エキセンディン 9-39 はまた、ラット大動脈における NJE の治療により血管弛緩を抑制した。これは、GLP-1R の活性化時に cAMP/PKA シグナル伝達に続いて NJE が CaMKK β /AMPK の活性化を刺激したことを示しています。

ノニ果実に含まれる植物化学物質には、イリドイド、フラボノイド、リグノイド、クマリン、トリテルペノイド、フェノール酸、ミネラル、ビタミンなどが含まれます。本研究では、LC-MS 分析により、ノニジュースには 2 つのイリドイド、アスペルロシド酸と DAA に分類できる 7 つの主成分が含まれていることが示されました。リグノイド、スコポレチン; クマリン、モリンドリン; および脂肪酸配糖体。以前の研究では、低血糖と抗酸化作用を持つノニ果実の主要なイリドイド DAA が報告されています (Deng & West, 2011; Ma, Mai, Su, および West Brett, 2013)。私たちの研究は、DAA がノニジュース中の重要な生物活性イリドイド化合物であり、HUVEC での NO 放出を改善する可能性があり、基礎となるシグナル伝達経路も NJE と同じであることを明らかにしています。これは、DAA がノニジュースの血圧を調節するのに効果的なイリドイドである可能性があることを示しています。

結論として、ノニジュース治療は、メタボリックシンドロームモデルによる遺伝性高血圧の血管拡張と、この研究の内皮細胞からの NO 産生を介した大動脈の血管弛緩を改善する可能性があります。NJE は、おそらく GLP-1R によって誘発される CaMKK β -AMPK-eNOS 経路を調節して、内皮依存性弛緩を改善し、したがって、おそらくその原因化合物の 1 つである DAA を介して血圧を低下させます。私たちの調査結果は、ノニジュースが高血圧の新しい血管内皮治療として潜在的に使用できることを示す invivo と invitro の両方の証拠を提供します。

ORCID

Jingxin Zhou <https://orcid.org/0000-0003-3734-9778> et

Wei Li <https://orcid.org/0000-0003-4143-8597>

参考文献

- Ahsan Shueb, M. C., Alwar, P. J., Shenoy, P. J., & Gokul, P. (2016). Effect of *Morinda citrifolia* (Noni) fruit juice on high fat diet induced dyslipidemia in rats. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*, 10(4), FF06-FF10.
- Cai, H., Liu, D., & Garcia, J. G. (2008). CaM kinase II-dependent pathophysiological signalling in endothelial cells. *Cardiovascular Research*, 77(1), 30-34.
- Chai, W., Dong, Z., Wang, N., Wang, W., Tao, L., Cao, W., & Liu, Z. (2012). Glucagon-like peptide 1 recruits microvasculature and increases glucose use in muscle via a nitric oxide-dependent mechanism. *Diabetes*, 61(4), 888-896.
- Chen, Z., Peng, I. C., Sun, W., Su, M. I., Hsu, P. H., Fu, Y.,... Shyy, J. Y. J. (2009). AMP-activated protein kinase functionally phosphorylates endothelial nitric oxide synthase Ser633. *Circulation Research*, 104, 496-505.

- Deng, S., West, B.J., Palu, K., & Jensen, C.J. (2011). Determination and comparative analysis of major iridoids in different parts and cultivation sources of *Morinda citrifolia*. *Phytochemical Analysis*, 22(1), 26-30.
- Fischer, T. H., Herting, J., Mason, F. E., Hartmann, N., Watanabe, S., Nikolaev, V. O., ... Sossalla, S. (2015). Late INa increases diastolic SR- Ca²⁺-leak in atrial myocardium by activating PKA and CaMKII. *Cardiovascular Research*, 107(1), 184-196.
- Fisslthaler, B., & Fleming, I. (2009). Activation and signaling by the AMP- activated protein kinase in endothelial cells. *Circulation Research*, 105, 114-127.
- Fleming, I., & Busse, R. (2003). Molecular mechanisms involved in the regulation of the endothelial nitric oxide synthase. *American Journal of Physiology*, 284(1), R1-R12.
- Fleming, I., Fisslthaler, B., Dimmeler, S., Kemp, B. E., & Busse, R. (2001). Phosphorylation of Thr(495) regulates Ca(2+)/calmodulin-dependent endothelial nitric oxide synthase activity. *Circulation Research*, 88(11), E68-E75.
- Fulton, D., Gratton, J. P., McCabe, T.J., Fontana, J., Fujio, Y., Walsh, K., ... Sessa, W. C. (1999). Regulation of endothelium- derived nitric oxide production by the protein kinase Akt. *Nature*, 399(6736), 597- 601.
- Garcia-Cardena, G., Fan, R., Stern, D. F., Liu, J., & Sessa, W. C. (1996). Endothelial nitric oxide synthase is regulated by tyrosine phosphorylation and interacts with caveolin-1. *The Journal of Biological Chemistry*, 271(44), 27237-27240.
- Gilani, A. H., Mandukhail, S. U., Iqbal, J., Yasinza, M., Aziz, N., Khan, A., & Najeeb-ur-Rehman. (2010). Antispasmodic and vasodilator activities of *Morinda citrifolia* root extract are mediated through blockade of voltage dependent calcium channels. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 10, 2.
- Goud, A., Zhong, J., Peters, M., Brook, R. D., & Rajagopalan, S. (2016). GLP-1 agonists and blood pressure: A review of the evidence. *Current Hypertension Reports*, 18(2), 16.
- Graaf, C. D., Donnelly, D., Wootten, D., Lau, J., Sexton, P. M., Miller, L. J., ... Wang, M. W. (2016). Glucagon-like Peptide-1 and its class B G protein-coupled receptors: A long march to therapeutic successes. *Pharmacological Reviews*, 68(4), 954-1013.
- Hermann, M., Flammer, A., & Lüscher, T. F. (2006). Nitric oxide in hypertension. *Journal of Clinical Hypertension*, 8(12 Suppl. 4), 17-29.
- Higashi, Y., Kihara, Y., & Noma, K. (2012). Endothelial dysfunction and hypertension in aging. *Hypertension Research*, 35(11), 1039-1047.
- Kanazawa, I., Yamaguchi, T., Yano, S., Yamauchi, M., & Sugimoto, T. (2008). Metformin enhances the differentiation and mineralization of osteoblastic MC3T3-E1 cells via AMP kinase activation as well as eNOS and BMP-2 expression. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 375, 414-419.
- Ke, J., Liu, Y., Yang, J., Lu, R., Tian, Q., Hou, W., ... Hong, T. (2017). Synergistic effects of metformin with liraglutide against endothelial dysfunction through glp-1receptor and pka signalling pathway. *Scientific Reports*, 7, 41085.
- Kieffer, T. J., & Habener, J. F. (1999). The glucagon-like peptides. *Endocrine Reviews*, 20, 876-913.
- Kolluru, G. K., Siamwala, J. H., & Chatterjee, S. (2010). eNOS phosphorylation in health and disease. *Biochimie*, 92(9), 1186-1198.
- Lewington, S., Clarke, R., Qizilbash, N., Peto, R., & Collins, R. (2002). Prospective studies collaboration. Age-specific relevance of usual blood pressure to vascular mortality: A meta-analysis of individual data for one million adults in 61 prospective studies. *Lancet*, 360(9349), 1903-1913.
- Li, Q., Yon, J. Y., & Cai, H. (2015). Mechanisms and consequences of eNOS dysfunction in hypertension. *Journal of Hypertension*, 33(6), 1128-1136.

- Li, Q., Youn, J. Y., & Cai, H. (2015). Mechanisms and consequences of endothelial nitric oxide synthase dysfunction in hypertension. *Journal of Hypertension*, 33(6), 1128-1136.
- Li, X., Han, Y., Pang, W., Li, C., Xie, X., Shyy, J. Y., & Zhu, Y. (2008). AMP-activated protein kinase promotes the differentiation of endothelial progenitor cells. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 28, 1789-1795.
- Liu, L., Liu, J., Wong, T. W., Tian, X. Y., Lau, C. W., Wang, Y.,... Huang, Y. (2012). Dipeptidyl peptidase 4 inhibitor sitagliptin protects endothelial function in hypertension through a glucagon-like peptide 1-dependent mechanism. *Hypertension*, 60, 833-841.
- Ma, D. L., Mai, C., Su, C. X., & West Brett, J. (2013). In Vivo Antioxidant Activity of Deacetylasperulosidic Acid in Noni. *Journal of Analytical Methods in Chemistry*, 2013, 804504. <https://doi.org/10.1155/2013/804504>
- Matsushita M, Nairn AC. Inhibition of the Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase I cascade by cAMP-dependent protein kinase. *Journal of Biological Chemistry*. 1999, 9;274(15):10086-93.
- Mckoy, M. G., Thomas, E. A., & Simon, O. R. (2002). Preliminary investigations of anti-inflammatory properties of an aqueous extract from *Morinda citrifolia* (Noni). *Proceedings of the Western Pharmacology Society*, 45, 76-78.
- Michel, T., & Vanhoutte, P. M. (2010). Cellular signaling and NO production. *Pflügers Archiv*, 459(6), 807-816.
- Michell, B. J., Chen, Z., Tiganis, T., Stapleton, D., Katsis, F., Power, D. A.,... Kemp, B. E. (2001). Coordinated control of endothelial nitric-oxide synthase phosphorylation by protein kinase C and the cAMP-dependent protein kinase. *The Journal of Biological Chemistry*, 276(21), 17625-17628.
- NCD Risk Factor Collaboration (NCD-RisC). (2017). Worldwide trends in blood pressure from 1975 to 2015: A pooled analysis of 1479 population-based measurement studies with 19.1 million participants. *Lancet*, 389(10064), 37-55.
- Nguyen, A., & Cai, H. (2006). Netrin-1 induces angiogenesis via a DCC-dependent ERK1/2-eNOS feed-forward mechanism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(17), 6530-6535.
- Nystrom, T., Gutniak, M. K., Zhang, Q., Zhang, F., Holst, J. J., Ahren, B., & Joholm, A. (2004). Effects of glucagon-like peptide-1 on endothelial function in type 2 diabetes patients with stable coronary artery disease. *American Journal Physiology and Endocrinology and Metabolism*, 287, E1209-E1215.
- Sanz, P. (2008). AMP-activated protein kinase: Structure and regulation. *Current Protein & Peptide Science*, 9, 478-492.
- Schulz, E., Jansen, T., Wenzel, P., Daiber, A., & Münzel, T. (2008). Nitric oxide, tetrahydrobiopterin, oxidative stress, and endothelial dysfunction in hypertension. *Antioxidants & Redox Signaling*, 10(6), 1115-1126.
- Shenoy, J. P., Pai, P. G., Shoeb, A., Gokul, P., Kulkarni, A., & Kotian, M. S. (2011). An evaluation of diuretic activity of *Morinda citrifolia* (Linn) (noni) fruit juice in normal rats. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 3, 119-121.
- Swulius, M. T., & Waxham, M. N. (2008). Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinases. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 65(17), 2637-2657.
- Takaya, K., Ogawa, Y., Hiraoka, J., Hosoda, K., Yamori, Y., Nakao, K., & Koletsky, R. J. (1996). Nonsense mutation of leptin receptor in the obese spontaneously hypertensive Koletsky rat. *Nature Genetics*, 14 (2), 130-131.

- Wang, M. Y., West, B. J., Jensen, C. J., Nowicki, D., Su, C., Palu, A. K., & Anderson, G. (2002). *Morinda citrifolia* (noni): A literature review and recent advances in noni research. *Acta Pharmacologica Sinica*, 23(12), 1127-1141.
- Wigati, O., Anwar, K., & Sudarsono, N. A. E. (2017). Hypotensive activity, of Ethanolic extracts of *Morinda citrifolia* L. leaves and fruit in dexamethasone-induced hypertensive rat. *Journal of Evidence Based Complementary and Alternative Medicine*, 22(1), 107-113.
- Woods, A., Dickerson, K., Heath, R., Hong, S. P., Momcilovic, M., & Johnstone, S. R. (2005). Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase kinase-beta acts upstream of AMP-activated protein kinase in mammalian cells. *Cell Metabolism*, 2, 21-33.
- Wu, T., Sun, J., Kagota, S., Maruyama, K., Wakuda, H., & Shinozuka, K. (2016). Panax notoginseng saponins ameliorate impaired arterial vasodilation in SHRSP.Z-Leprfa/lzmDmcr rats with metabolic syndrome. *Clin Exp Pharmacol P*. <https://doi.org/10.1111/1440-1681.12547>
- Wu, T., Sun, J., Kagota, S., Maruyama, K., Wakuda, H., & Shinozuka, K. (2016). Panax notoginseng saponins ameliorate impaired arterial vasodilation in SHRSP.Z-Leprfa/lzmDmcr rats with metabolic syndrome. *Clin Exp Pharmacol P*. <https://doi.org/10.1111/1440-1681.12547>
- Yang, X. H., Li, P., Yin, Y. L., Tu, J. H., Dai, W., Liu, L. Y., & Wang, S. X. (2015). Rosiglitazone via PPAR γ -dependent suppression of oxidative stress attenuates endothelial dysfunction in rats fed homocysteine thiolactone. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 19(4), 82-835.
- Youn, J. Y., Wang, T., & Cai, H. (2009). An ezrin/calpain/P13K/AMPK/eNOSs1179 signaling cascade mediating VEGF-dependent endothelial nitric oxide production. *Circulation Research*, 104(1), 50-59.

サポート情報

追加のサポート情報は、この記事の最後にある「サポート情報」セクションでオンラインで見つけることができます。

How to cite this article: Yoshitomi H, Zhou J, Nishigaki T, et al. *Morinda citrifolia* (Noni) fruit juice promotes vascular endothelium function in hypertension via glucagon-like peptide-1 receptor-CaMKK β -AMPK-eNOS pathway.

Phytotherapy Research. 2020;34:2341-2350. <https://doi.org/10.1002/ptr.6685>