

原 著

## 単球挙動解析によるエラグ酸の 抗動脈硬化作用の細胞工学的検証

片岡則之\*<sup>1</sup> 長野隆男\*<sup>2</sup>

### 要 約

現在我が国では、アテローム性動脈硬化症関連疾患が主要な死亡要因になっており、発症メカニズムの解明、ならびに予防法の確立が急務である。これまでの我々を含む多くの研究から、動脈形状に依存した血流状態が血管内皮細胞の障害を引き起こし、病変発生につながる事が明らかとなっている。一方、高脂血症や糖尿病、高血圧、喫煙が病変の進行を早める危険因子であることは疑いない。よって、運動や食生活などの生活習慣の改善はその予防に有効である。ところで、ザクロなどの食品に多く含まれるポリフェノールには抗酸化作用やアレルギー抑制作用があることが知られている。ポリフェノールの一種であるエラジタンニン<sup>1</sup>は生体内で直接吸収されず、エラグ酸や腸内細菌により分解された代謝物の形で吸収される。エラグ酸は強力な抗酸化活性を持つことが報告されており、動脈硬化抑制作用を持つことが期待される。本研究では、詳細な単球挙動の観察からエラグ酸の抗動脈硬化作用を検証した。多孔質メンブレンカップ上に内皮細胞を培養し、IL-1 $\beta$ を内皮細胞上に、酸化LDLを内皮細胞下に添加して、培養細胞を用いた動脈硬化モデルを作成し、そこに単球を添加してメンブレン下に浸潤・落下した単球をカウントした。その結果、エラグ酸を添加した群では内皮細胞層を浸潤・メンブレン下に落下した単球が減少した。コラーゲンゲル上に培養した内皮細胞に単球を添加して挙動を実時間で観察した結果、IL-1 $\beta$ および酸化LDLを添加した状態での内皮細胞上の単球は非常に活発に遊走し、また一部で内皮下への浸潤も観察された。一方、エラグ酸を加えた場合には、単球の内皮細胞への接着や遊走、浸潤が顕著に抑制された。以上の結果より、エラグ酸を投与した場合には単球の内皮細胞への接着、遊走、浸潤の全てが抑制されることが確認され、エラグ酸は強力な抗動脈硬化作用を持つことが検証できた。

### 1. 緒言

現在我が国では、心疾患や脳血管疾患など、アテローム性動脈硬化症（以下 動脈硬化）関連疾患が主要な死亡要因になっており<sup>1)</sup>、その発症メカニズムの解明、治療法、予防法の確立が急務である。動脈硬化発症のプロセスはよく研究されている。血中脂質、とくに低密度リポタンパク（LDL）の増加、また、その酸化（酸化LDL）、血管内面に一層に存在する血管内皮細胞での炎症の発生、内皮細胞下での酸化LDLの蓄積が病変発症の引き金となる<sup>2,3)</sup>。これまでの研究から、動脈形状に依存した血流状態が血管内皮細胞の炎症、障害を引き起こし、酸化

LDLの内皮下への蓄積につながる事が明らかとなっており<sup>4)</sup>、またさらに、内皮下に蓄積した酸化LDLも内皮細胞の障害をより進展させることも分かっている<sup>5)</sup>。炎症、障害の発生した内皮細胞では、ICAM-1、VCAM-1などといった、白血球に対する接着タンパクの発現が増加し、MCP-1 (Monocyte Chemoattractant Protein-1)などの単球の誘引物質の産生増加も生ずる<sup>6)</sup>。その後、単球はこれら動脈の炎症部位に接着、内皮下に浸潤、マクロファージへと分化し、蓄積した酸化LDLを貪食する。過剰に酸化LDLを貪食したマクロファージは泡沫化し、粥腫（アテローム）の形成へとつながっていく<sup>3)</sup>。

\*1 日本大学 工学部 機械工学科

\*2 川崎医療福祉大学 医療技術学部 臨床栄養学科

(連絡先) 片岡則之 〒963-8642 福島県郡山市田村町徳定字中河原1 日本大学 工学部

E-mail: kataoka@mech.ce.nihon-u.ac.jp

ところで、食品に多く含まれるポリフェノールには抗酸化作用やアレルギー抑制作用があることが知られている<sup>7)</sup>。ポリフェノール的一种であるエラジタンニン<sup>8)</sup>は生体内で直接吸収されず、エラグ酸や腸内細菌により分解された代謝物の形で吸収される。エラグ酸は幅広い植物に含まれており、特にザクロやイチゴ、ベリー類、ナッツ類に多く含まれている<sup>8)</sup>。エラグ酸は強い抗酸化作用を持ち、糖尿病<sup>9)</sup>やガン<sup>10)</sup>、炎症<sup>11)</sup>に効果があることが報告されている。エラグ酸の強い抗酸化作用から、動脈硬化抑制作用を持つことが大きく期待される。

先に述べたように、動脈硬化発生過程では白血球の一種である単球の内皮細胞層への接着、内皮下への浸潤が重要である。我々は多孔質高分子膜上に培養した内皮細胞へ単球を添加した際の膜下面への浸潤挙動、あるいはコラーゲンゲル上に培養した内皮細胞上の単球挙動解析など、細胞工学的手法を用いてエラグ酸の抗動脈硬化作用の実験的検証を行った。

## 2. 実験方法

### 2.1 実験に用いた細胞および培養方法

本研究では、ヒト臍帯静脈由来培養内皮細胞（クラボウ）を購入して実験に用いた。内皮細胞は、あらかじめ培養面積 $1\text{cm}^2$ あたり $1\text{mg}$ のフィブロネクチン（Merck Millipore）でコートした培養フラスコに播種し、ウシ胎児血清、抗生物質（ペニシリン、ストレプトマイシン）、各種成長因子を含むHu-media EG2（クラボウ）を用い、 $\text{CO}_2$  5%、湿度100%のインキュベーター内で培養した。

単球は、健康なボランティアから血液を採取し、単球のみを分離して用いた。実験の実施に際して、川崎医療福祉大学倫理委員会の承認を受けた（承認番号：334 承認日：H24.7.5）。血液の採取は、川崎医療福祉大学健康管理センターにて、医師、あるいは看護師の免許を持つ教員が採血を行った。

血液からの単球の分離は以下の手順で行った。

被験者から血液を約 $5\text{cc}$ 採血したのち、 $15\text{mL}$ 遠沈管に移してEDTA（Sigma-Aldrich） $100\mu\text{L}$ を加え、単球以外の細胞成分を結合する作用のあるロゼッタセップ（VERITAS） $500\mu\text{L}$ を加えて転倒混和し室温で20分間静置した。その後、PBS(-)（Gibco） $5\text{mL}$ 、EDTA  $50\mu\text{L}$ を加えて転倒混和した。Density medium（HISTOPAQUE; SIGMA） $5\text{mL}$ を新しい $15\text{mL}$ 遠沈管に入れ、その上に上述の希釈した血液を静かに加えた。遠沈管を遠心分離機にセットし、 $1200\text{g}$ で20分間、遠心分離を施した。遠心分離後、遠沈管の最下部に赤血球、血小板などの結合した細胞層、次にDensity medium、

単球層、PBS(-)の各層に分離するので、まず、上澄みのPBS(-)を除去し、その後注意深く単球層を新しい $15\text{mL}$ 遠沈管に移した。そこに、再度、PBS(-) $5\text{mL}$ 、EDTA  $50\mu\text{L}$ を加えて $300\text{g}$ で5分間、遠心分離を行った。上澄みを除去したのち、Caイオン、Mgイオンが入っていないハンクスバッファー（HBSS; Gibco）にヒト血清アルブミン（HBSS  $10\text{mL}$ に対して $200\mu\text{L}$ ）を混入した溶液中で培養し、得られた単球数を血球計算盤で計数した。

実験時には、以下の述べる2つの条件で内皮細胞を培養した。

#### 1) 多孔質メンブレンカップ上での培養

あらかじめフィブロネクチンコートした直径 $23\text{mm}$ 、孔径 $3\mu\text{m}$ のPET多孔質膜の張られたメンブレンカップ（Cell Culture Insert; BD Falcon）に内皮細胞を播種し、コンフルエントになるまで2~3日、 $\text{CO}_2$  5%、湿度100%のインキュベーター内で培養した。培養液はHu-media EG2（クラボウ）を用いた。

#### 2) コラーゲンゲル上での培養

プラスチック培養ディッシュ上（ $35\text{mm}$ ; BD Falcon）に以下の方法でコラーゲンゲル層を作成した。コラーゲンゲル作成には、新田ゼラチン製のゲル作製キットを使用した。同キットは以下の各溶液から構成されている。

A液：0.3% Cellmatrix Type I-A（豚腱由来の酸可溶性 Type I コラーゲン溶液）

B液：F12濃縮培地（10倍）

MEM 濃縮培地（10倍）

C液：再構成用緩衝液

コラーゲンは常温でゲル化するため、各溶液は水中で冷却して保存し、溶液の混合も水中で行った。

A液 $80\mu\text{L}$ とB液（F12） $5\mu\text{L}$ 、B液（MEM） $5\mu\text{L}$ をよく混合した後、C液 $10\mu\text{L}$ を加えてよく混合した。混合したコラーゲン溶液をプラスチックディッシュ（ $35\text{mm}$ ）に $40\mu\text{L}$ 滴下し、シグマコート（Sigma）で疎水処理したカバーガラスで上から押さえつけ、均一な厚さのコラーゲン層を作り、常温で10~20分放置した。この作業で、高倍率（20倍~40倍）の位相差顕微鏡観察が可能な $40\mu\text{m}$ 以下のゲル層が作製できた。

また、上記と同様にコラーゲン溶液を作り、酸化LDL（Bio-Rad AbD Serotec） $1.5\mu\text{L}$ をよく混合してディッシュに $40\mu\text{L}$ 滴下し、ゲルを作製した。

### 2.2 実験手順

培養実験系での動脈硬化モデル作成のため、内皮細胞を炎症性サイトカインであるIL-1 $\beta$ （R&D Systems）で刺激を加えた試料、あるいはIL-1 $\beta$ と

ともに内皮細胞下に酸化 LDL を添加した試料, さらにそこにエラグ酸 (Sigma-Aldrich) を添加した試料を準備した。

1) 多孔質メンブレン下への浸潤・落下した単球数計測

十分にコンフルエント状態まで多孔質メンブレン上に増殖した内皮細胞を炎症性サイトカインである IL-1 $\beta$  (1ng/mL, 2 $\mu$ L) で4~5時間刺激を加えた。IL-1 $\beta$  は図 1 に示すように内皮細胞上に添加した。酸化 LDL (1ng/mL, 10 $\mu$ L) は内皮細胞下, すなわち多孔質メンブレンの下側に添加した。エラグ酸 (80 $\mu$ mol/L in DMSO, 24 $\mu$ L) は, 内皮細胞上に添加した。なお, IL-1 $\beta$  のみ, あるいは IL-1 $\beta$  + 酸化 LDL で刺激を負荷したディッシュには, DMSO (Sigma-Aldrich) を24 $\mu$ L 加えた。下記の3種類のメンブレンカップを準備した。

- ① IL-1 $\beta$  2 $\mu$ L (1ng/mL) + DMSO 24 $\mu$ L
- ② IL-1 $\beta$  2 $\mu$ L + oxLDL (2 $\mu$ g/mL) 10 $\mu$ L (メンブレン下) + DMSO 24 $\mu$ L
- ③ IL-1 $\beta$  2 $\mu$ L + oxLDL + エラグ酸 (80 $\mu$ mol/L $\times$ 1000) 24 $\mu$ L (メンブレン上)

単球は分離後, Ca, Mg イオンの入ったハンクスバッファ (HBSS) に懸濁して3等分し, 上記3種類のメンブレンカップ, 内皮細胞上に添加した。単球の添加3時間後, 位相差顕微鏡で多孔質膜下部に浸潤落下してディッシュ底面に接着した単球の画像を実験ごとに20枚取得し, ディッシュ底面の単位面積あたりの浸潤した単球を計数, それにディッシュ底面積をかけて浸潤した単球数とした。「浸潤した単球数」を「添加した単球数」で割ることによ

て「浸潤した単球の割合」を算出した。

2) 内皮細胞上の単球の3次元浸潤挙動

コラーゲンゲル上に培養した内皮細胞も, 単球添加前に IL-1 $\beta$  (1ng/mL, 2 $\mu$ L) で4~5時間刺激を加えた。また別途, あらかじめ酸化 LDL をコラーゲンゲル内に包埋した試料を用意し, 単球の添加前4~5時間, IL-1 $\beta$  で刺激を加えた。エラグ酸の影響を観る群では, IL-1 $\beta$  と同時にエラグ酸 (80 $\mu$ mol/L) 24 $\mu$ L を添加した。

ゲル上の内皮細胞に単球を添加直後, 培養ディッシュを位相差顕微鏡ステージ上のインキュベーターに設置し, 温度37 $^{\circ}$ C, CO $_2$  5% の状態に保った。これを20倍の対物レンズをとおして, 位相差顕微鏡に接続された CCD カメラにて30秒に1画像ずつ, 画像を取得し, コンピューター (PowerMac G4) に保存した。

3. 実験結果

孔径2 $\mu$ m の多孔質メンブレンに培養した内皮細胞に単球を添加した際の内皮下への単球の浸潤割合を図 2 に示す。単球浸潤割合は, 1 回目の実験では 14.0% (IL-1 $\beta$ ), 36.2% (IL-1 $\beta$  + oxLDL), 15.2% (IL-1 $\beta$  + oxLDL + エラグ酸), 2 回目の実験では, 2.7% (IL-1 $\beta$ ), 7.2% (IL-1 $\beta$  + oxLDL), 1.4% (IL-1 $\beta$  + oxLDL + エラグ酸), 3 回目の実験では, 33.5% (IL-1 $\beta$ ), 22.4% (IL-1 $\beta$  + oxLDL), 4.1% (IL-1 $\beta$  + oxLDL + エラグ酸) となった。これらの結果より, エラグ酸の添加により, IL-1 $\beta$  と oxLDL の両方を添加した動脈硬化モデルの内皮細胞における単球の内皮下浸潤が抑制されることが確認できた。

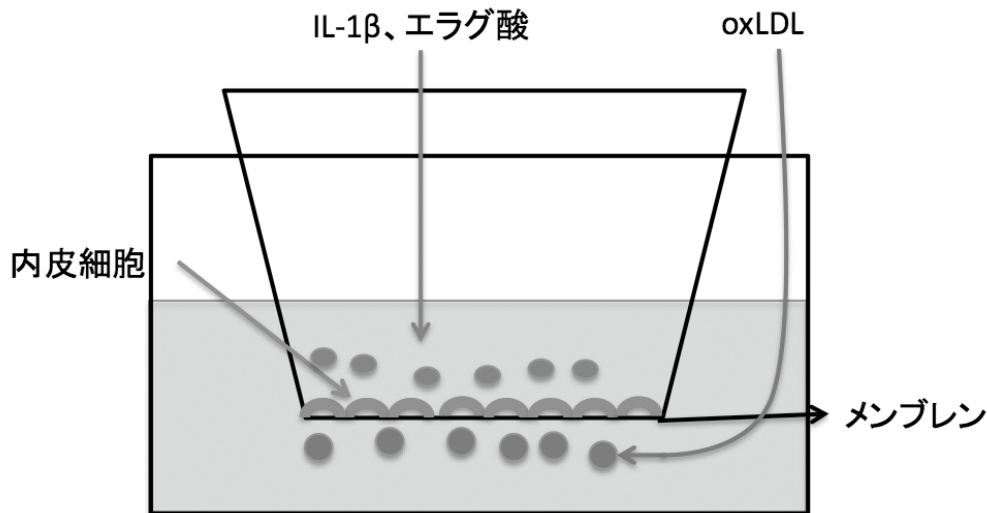


図 1 多孔質メンブレン上の内皮細胞, ならびに添加した薬剤の模式図

コラーゲングル上に培養した内皮細胞と添加した単球の顕微鏡像を図3に示す。IL-1 $\beta$ で刺激を负荷された内皮細胞はやや細長い形状を示し、ゲル上に隙間なく増殖している。画像中、やや明るく光った

丸い細胞は内皮細胞に十分に接着していない単球である。いっぽう、黒っぽく、扁平で多くの仮足を伸ばしているのは、強固に内皮細胞に接着した単球である。図4にIL-1 $\beta$ で刺激を负荷した内皮細胞にお

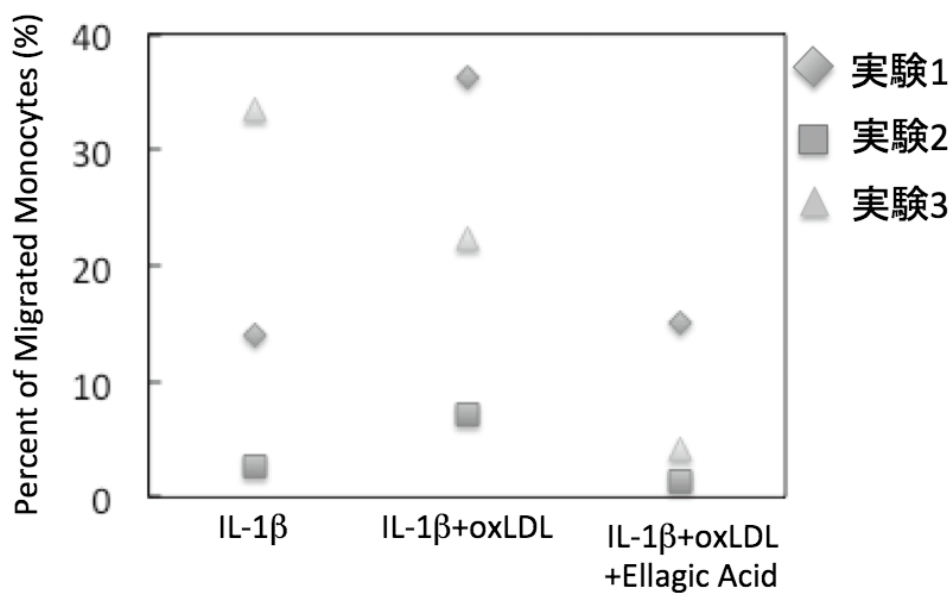


図2 各条件下の内皮細胞に単球を添加して3時間後の浸潤・落下した割合

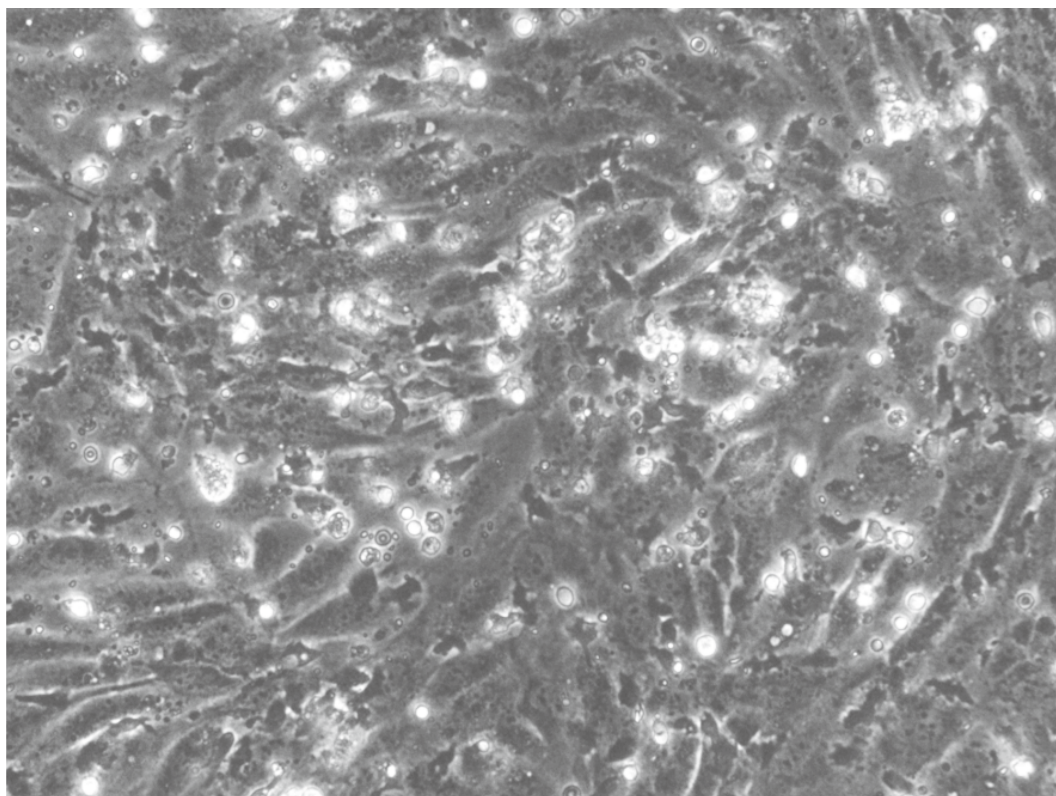


図3 IL-1 $\beta$ で刺激负荷した内皮細胞上の単球

ける単球挙動を示す。図中の矢印は、活発に遊走した単球の例を示す。図5にIL-1 $\beta$ とoxLDLを添加した内皮細胞における単球挙動を示す。図3と同様、図中の矢印は遊走した単球を示している。図5中の左側の矢印で示した単球は10分後に浸潤し、右の矢印で示した単球は1時間にわたって常に遊走してい

た。図6に、単球が浸潤した部位を拡大して一連の画像を示す。図中、矢印で示す単球が画像取得開始180秒後に内皮下に浸潤し、視野から消失していることが分かる。

このように、取得画像を詳細に観察することにより、単球の浸潤する様子が実時間で確認できること

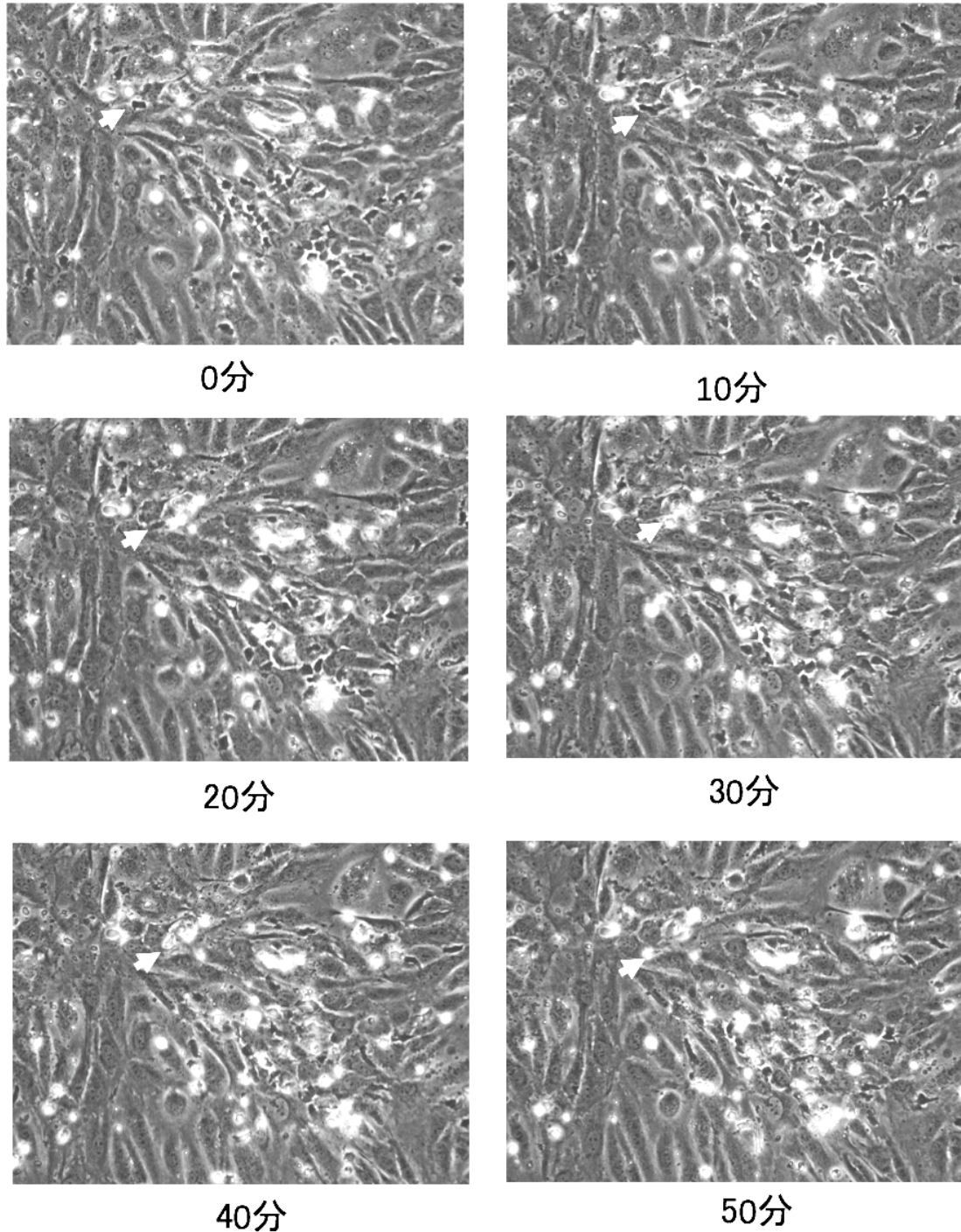


図4 IL-1 $\beta$ で刺激負荷したコラーゲンゲル上の内皮細胞における単球挙動の経時変化  
 図中矢印で示す単球は、活発に遊走した典型例

から、単球浸潤頻度の比較を行った。IL-1 $\beta$ を添加した内皮細胞へ浸潤した平均単球数は3個/時間、IL-1 $\beta$ ・oxLDLを添加した内皮細胞へ浸潤した平均単球数は10個/時間であった。これより、より重度の炎症を模擬した内皮細胞における単球浸潤頻度の方が高いことが分かった。また、IL-1 $\beta$ を添加し

た内皮細胞に比べIL-1 $\beta$ ・oxLDLを添加した内皮細胞の方が単球の遊走が活発であった。

IL-1 $\beta$ ・oxLDLにエラグ酸を添加した場合の顕微鏡画像を図7に示す。内皮細胞に接着している単球は1画像中に10個以下程度と激減し、時間を追って単球の遊走を観察しても、ほとんど動きが観察さ

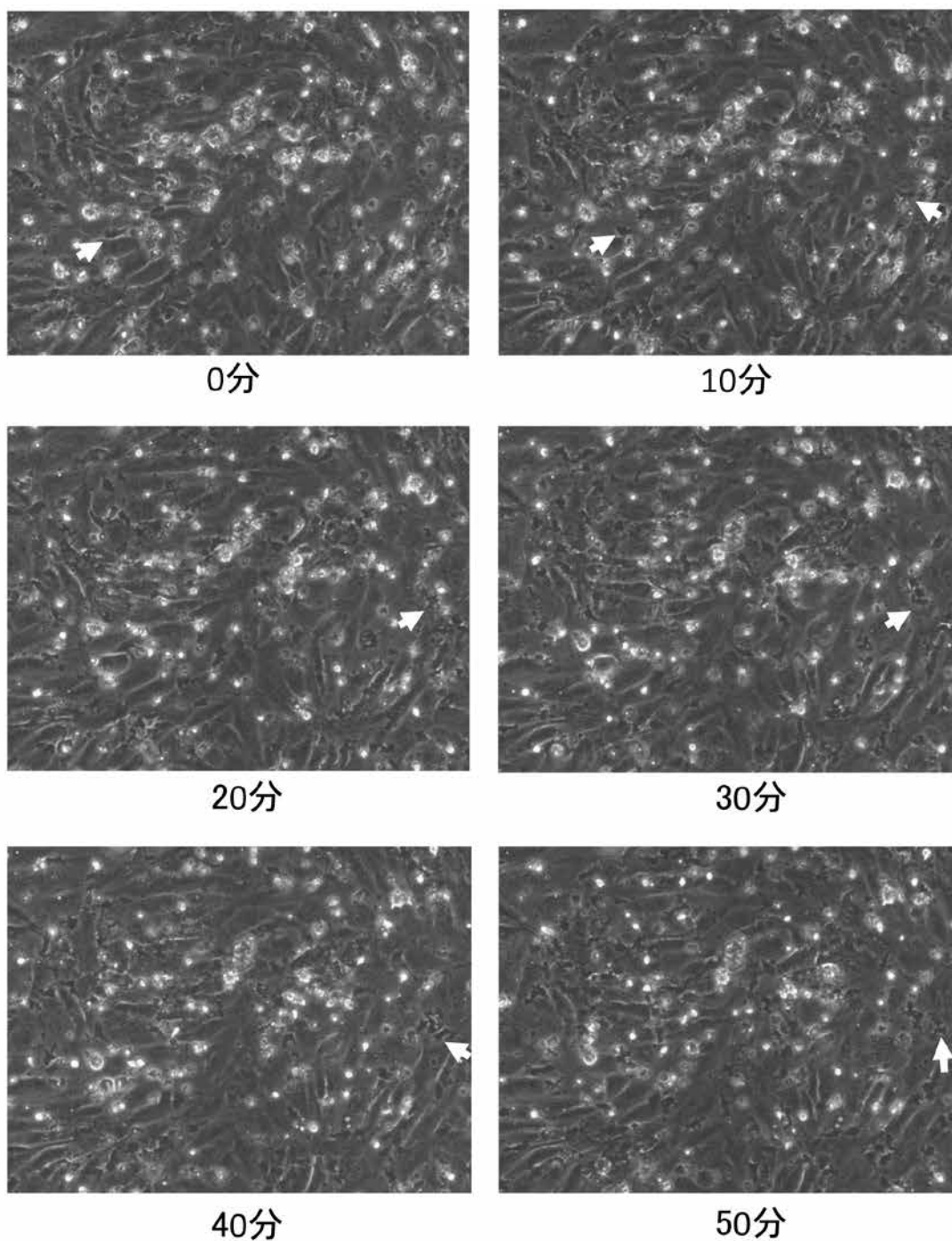


図5 IL-1 $\beta$ とoxLDLで刺激負荷したコラーゲンゲル上の内皮細胞における単球挙動の経時変化  
図中の左矢印で示す単球は、10分後に浸潤。右矢印の単球は1時間以上、活発に遊走した。

れなかった。

4. 考察

本研究では、多孔質メンブレン上に培養した内皮細胞を炎症サイトカイン、あるいは酸化LDLで刺激した動脈硬化モデルを作成し、そこに単球を添加してメンブレン下への単球浸潤・落下を評価した。また、より生体内に近い条件で単球挙動を解析するため、非常に薄いコラーゲンを作成し、その上に培養した内皮細胞に同様の刺激を負荷したうえ、添加した単球挙動を実時間で観察した。その結果、動脈硬化モデルの内皮細胞にエラグ酸を投与した場合には、単球の接着、遊走、浸潤の全てが抑制されることが確認された。

図2に示す単球の浸潤割合の傾向が実験によって異なるのは、全ての単球が同じ挙動をするわけではない、ということに起因する。以前、我々が行った

単球の内皮細胞上での挙動を詳細に観察した結果では<sup>12)</sup>、内皮細胞に接着した単球の70%が内皮下への浸潤を開始、そのうち80%の単球しか浸潤を完了しなかった。内皮細胞に接着した単球のうち、55%しか浸潤しなかったという結果であった。このような個々の単球挙動の違いは、単球表面に発現している各種受容体、単球が浸潤しようとした内皮細胞表面に発現している受容体などの違い、またそれらに起因する薬物に対する応答性の違いだと考えられる。本研究の実験では、3万から10万個の単球を内皮細胞に添加しているが、全ての単球挙動を解析することは出来ず、そのうち500から1000個程度の単球挙動を解析し、その条件の単球挙動の代表としている。1例(図2中 実験3)で、IL-1 $\beta$ のみを添加した場合よりも、IL-1 $\beta$ とoxLDLの両方を添加した場合に単球浸潤割合が減少していたが、上述のように、単球の個々の挙動にばらつきがあることが

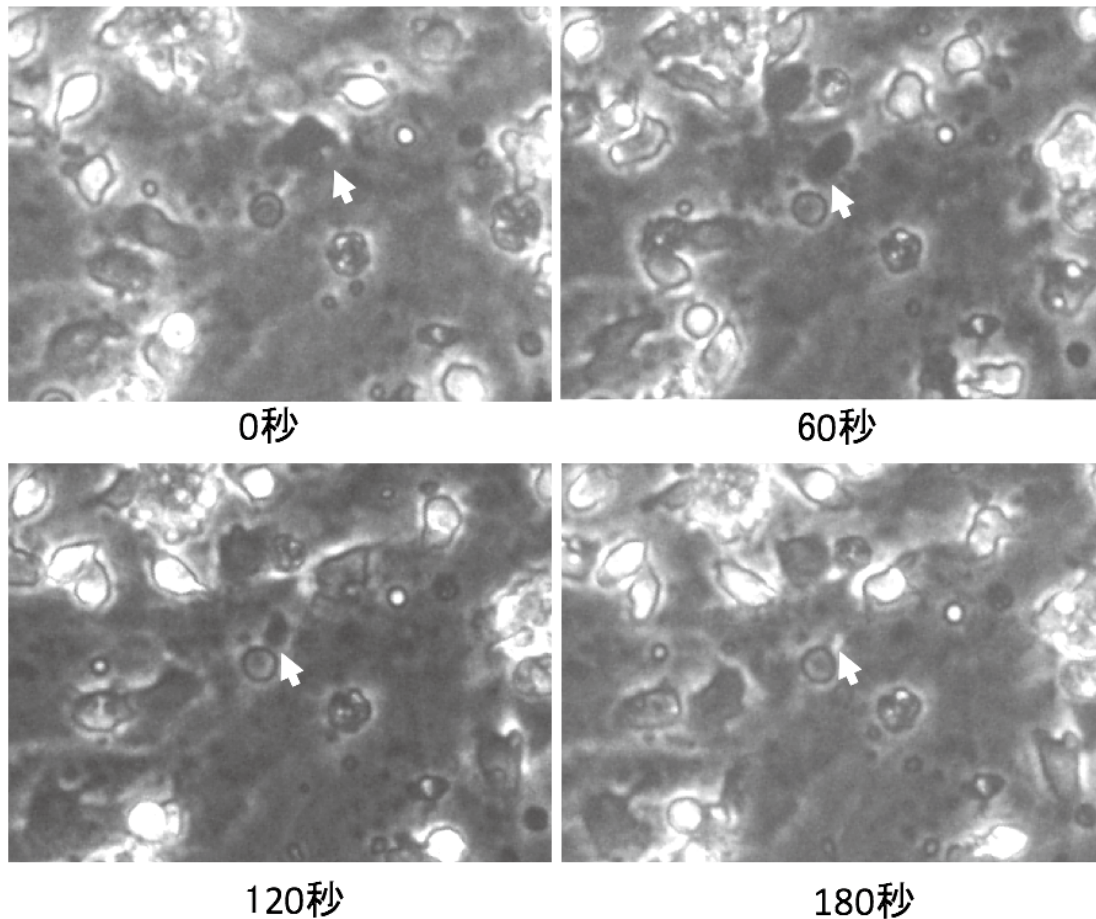


図6 IL-1 $\beta$ とoxLDLで刺激負荷したコラーゲングル上の内皮細胞における単球挙動の経時変化(図7の単球が浸潤した部位を拡大)  
矢印で示す単球が180秒後に浸潤

要因であると推測している。ただし、エラグ酸を投与した場合には、IL-1 $\beta$ とoxLDLの両方を添加した場合と比較して、全3例で単球浸潤割合が減少しており、平均的にエラグ酸は動脈硬化モデルにおいて単球の内皮下浸潤を抑制したと言える。

内皮細胞に炎症性サイトカインを投与すると、白

血球に対する接着タンパクの発現増加、単球の誘引物質（Monocyte Chemoattractant Factor 1; MCP-1）の産生増加が起こり、さらには内皮細胞層の物質透過性が亢進して内皮下の酸化LDLの蓄積が増加することが知られている<sup>6)</sup>。これまでの我々の研究では、内皮細胞に炎症性サイトカインに加えて、酸

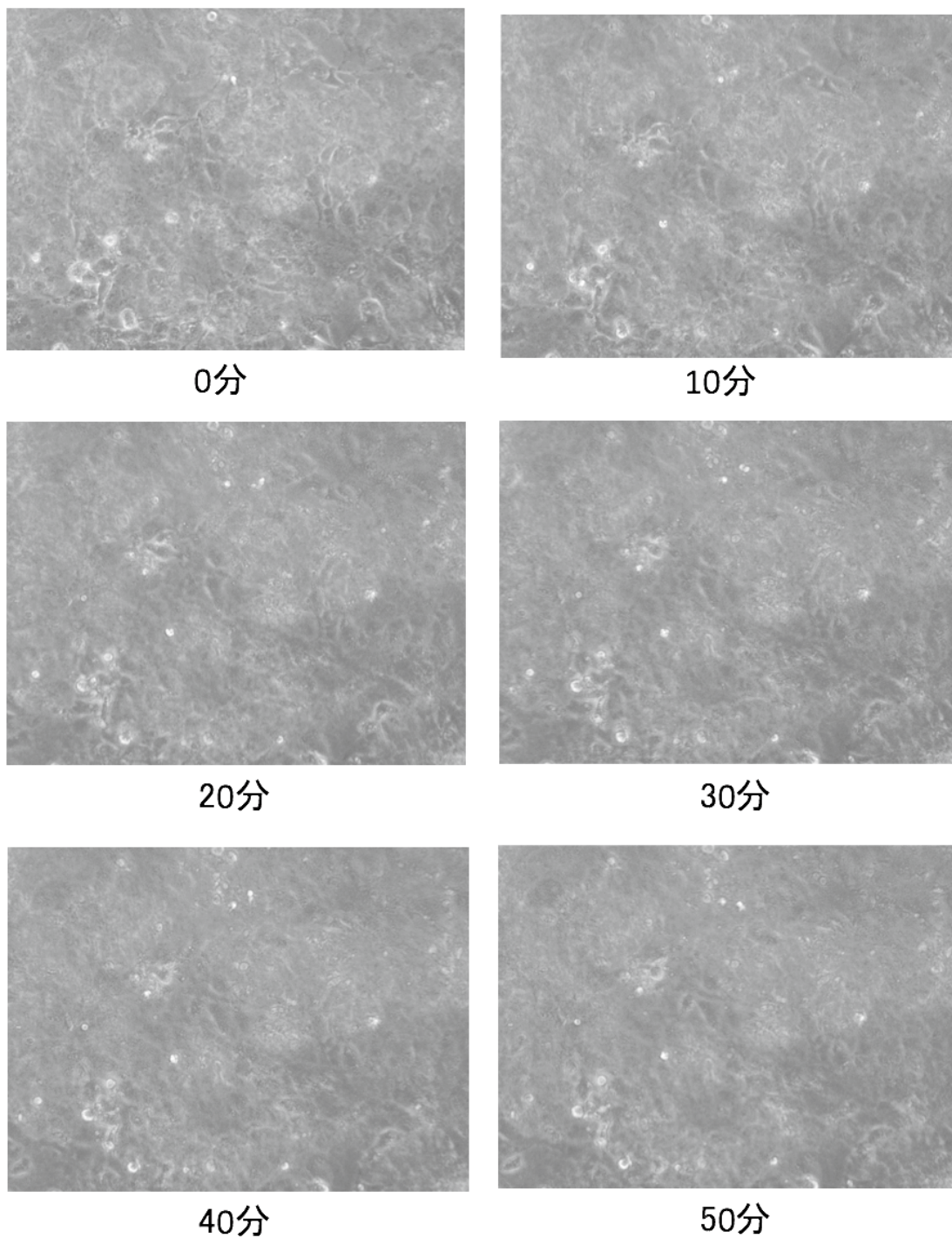


図7 IL-1 $\beta$ とoxLDL, さらにエラグ酸を添加したコラーゲンゲル上の内皮細胞における単球挙動の経時変化



化LDLを投与すると、内皮細胞間接着タンパクに影響を及ぼし、単球の浸潤が増加することを明らかにしてきた<sup>5)</sup>。今回の結果は、エラグ酸により炎症、あるいは酸化LDLによって引き起こされる内皮細胞の活性化のいずれもが抑制された可能性を示唆している。ただし、エラグ酸の抗動脈硬化作用をさらに検証するには、炎症、あるいは酸化LDLによって内皮細胞内の遺伝子発現がどのように変化するか、網羅的に検証する、内皮細胞間接着タンパクの発現、分布変化を計測する、さらには、内皮細胞間隙変化を実時間で計測し、物質透過性に及ぼす影響なども検証する必要がある。

ところで、本研究の結果では、エラグ酸は単球の遊走にも影響を及ぼしている可能性が観察された。特に、コラーゲンをを用いた動脈硬化モデルの内皮細胞にエラグ酸を投与した際には、単球の接着数が激減したことから、内皮細胞の白血球に対する接着タンパク発現抑制が生じたと考えられる。接着タンパクの発現抑制が生じたにもかかわらず、内皮細胞上の単球がほとんど遊走しないということは、エラグ酸が単球に直接影響を及ぼし、遊走能を低下させたと考えられる。ただしこれも、内皮細胞を介した間接的な影響か、エラグ酸による直接の作用かは断定できない。本研究の動脈硬化モデルは、複数細胞の共培養モデルであるため、単一種の細胞の評価が出来ない。これは、より生体内の病態モデル近づけた際に生ずるジレンマである。細胞の遊走能評価は、マイクロチャンバーを用いた評価がよく行われている<sup>13)</sup>。今後、生化学的な評価法のみではなく、

これらの手法を併用することで、より詳細なエラグ酸の影響を明らかにする予定である。

厚生労働省が発表した<sup>1)</sup>、我が国の平成26年度の死因は、第1位「悪性新生物」(37万人)、第2位「心疾患」(19万6,000人)、第4位「脳血管疾患」(11万3,000人)となっており)とアテローム性動脈硬化関連疾患による死亡者数は、第2位と第4位をあわせて30万人を上回っている。このような状況のなか、薬物や病院における治療に頼らず、食生活の改善で国民の健康維持や患者数の減少が可能になれば、社会的意義は非常に大きい。エラグ酸は幅広い植物に含まれており、特にザクロやイチゴ、ベリー類、ナッツ類に多く含まれている<sup>8)</sup>。今後、さらに研究を進め、エラグ酸の効果を分子・遺伝子レベルで解明するとともに、前述の食品を中心とした食生活の改善による健康維持、さらには治療に役立てていく所存である。

## 5. 結言

動脈硬化モデルの内皮細胞にエラグ酸を投与した場合には、単球の接着、遊走、浸潤の全てが抑制されることが確認された。今後、より詳細なメカニズムを解明することで、食生活の改善がアテローム性動脈硬化症の予防、治療につながる可能性が示唆された。

## 謝 辞

本研究は、平成26年度川崎医療福祉大学医療福祉研究費の補助を得て実施した。ここに記して感謝の意を表す。

## 文 献

- 1) 厚生労働省：平成26年（2014）人口動態統計の年間推計。 <http://www.mhlw.go.jp/toukei/saikin/hw/jinkou/suikei14/>, 2015（2015.7.31確認）
- 2) Glass CK and Witztum JL: Atherosclerosis: The road ahead. *Cell*, **104**(4), 503–16, 2001.
- 3) Swirski FK, Libby P, Aikawa E, Alcaide P, Luscinskas FW, Weissleder R and Pittet MJ: Ly-6Chi monocytes dominate hypercholesterolemia-associated monocytois and give rise to macrophages in atheromata. *Journal of Clinical Investigation*, **117**, 195–205, 2007.
- 4) Ross R: Atherosclerosis-an inflammatory disease. *New England Journal of Medicine*, **340**(2), 115–26, 1999.
- 5) Hashimoto K, Kataoka N, Nakamura E, Tsujioka K and Kajiya F: Oxidized LDL specifically promotes the initiation of monocyte invasion during transendothelial migration with upregulated PECAM-1 and downregulated VE-cadherin on endothelial junctions. *Atherosclerosis*, **194**(2), e9–17, 2007.
- 6) Gustafson B: Adipose tissue, inflammation and atherosclerosis. *Journal of Atherosclerosis and Thrombosis*, **17**(4), 332–341, 2010.
- 7) Rice-Evans C, Miller N and Paganga G: Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends in Plant Science*, **2**(4), 152–159, 1997.
- 8) Bakkalbaş E, Menteş O and Artik N: Food Ellagitannins-Occurrence, Effects of Processing and Storage. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, **49**(3), 2008
- 9) Mohan M, Waghulde H and Kasture S: Effect of pomegranate juice on Angiotensin II-induced hypertension in diabetic Wistar rats. *Phytotherapy Research*, **24**(2), S196–203, 2010.

- 10) Vicinanza R, Zhang Y, Henning SM and Heber D: Pomegranate Juice Metabolites, Ellagic Acid and Urolithin A, Synergistically Inhibit Androgen-Independent Prostate Cancer Cell Growth via Distinct Effects on Cell Cycle Control and Apoptosis. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, **2013**, 247504, Epub 2013.
- 11) Cornélio Favarin D, Martins Teixeira M, Lemos de Andrade E, de Freitas Alves C, Lazo Chica JE, Artério Sorgi C, Faccioli LH and Paula Rogerio A: Anti-inflammatory effects of ellagic acid on acute lung injury induced by acid in mice. *Mediators Inflammation*, **2013**, 164202, Epub 2013.
- 12) Hashimoto K, Kataoka N, Nakamura E, Asahara H, Ogasawara Y, Tsujioka K and Kajiya F: Direct observation and quantitative analysis of spatiotemporal dynamics of individual living monocytes during transendothelial migration. *Atherosclerosis*, **177**(1), 19–27, 2004.
- 13) Nitta N, Tsuchiya T, Yamauchi A, Tamatani T and Kanegasaki S: Quantitative analysis of eosinophil chemotaxis tracked using a novel optical device - TAXIScan. *Journal of Immunological Methods*, **320**(1–2), 155–163, 2007.

(平成28年1月12日受理)

## Effect of Ellagic Acid on the Monocyte Behavior on Endothelial Cells and Trans-endothelial Migration

Noriyuki KATAOKA and Takao NAGANO

(Accepted Jan. 12, 2016)

**Key words** : Ellagic Acid, Monocyte, Endothelial Cell, Atherosclerosis

### Abstract

Atherogenesis is a complex process based on inflammatory responses and cytokines, such as IL-1  $\beta$  and oxidized LDL (oxLDL), which are key mediators for activating endothelial cells. Anyway, Ellagic Acid, hydrolyzed from Ellagitannin which are bioactive polyphenols from the pomegranate, has been shown to have anti-allergic and anti-inflammatory effects. Therefore, Ellagic Acid has chemopreventive potential against atherogenesis. We evaluated the effects of Ellagic Acid on monocytes adhesion, migration and dynamics on activated endothelial cells (ECs) with inflammatory cytokine and oxidized LDL. We applied freshly isolated monocytes to IL-1  $\beta$  and/or oxLDL stimulated ECs seed on 6-well PET membrane cell culture inserts with 3- $\mu$ m pores, and counted the migrated monocytes underneath EC's monolayer. In the ECs stimulated with both IL-1  $\beta$  and oxLDL, 21.9% of applied monocytes were migrated into endothelial cell monolayer after 3 hours (6.9%). Ellagic Acid clearly decreased the monocyte trans-endothelial migration. Moreover, we investigated the monocyte behavior on ECs cultured on collagen gel. Ellagic Acid inhibits not only monocyte trans-endothelial cell migration, but also monocyte adhesion and crawling on ECs. These results suggest that Ellagic Acid has advanced effects on anti-atherogenic response.

Correspondence to : Noriyuki KATAOKA

Department of Mechanical Engineering  
College of Engineering, Nihon University  
Koriyama, 963-8642, Japan

E-mail : [kataoka@mech.ce.nihon-u.ac.jp](mailto:kataoka@mech.ce.nihon-u.ac.jp)

(Kawasaki Medical Welfare Journal Vol.25, No.2, 2016 269 – 279)