

平成 30 年 6 月 18 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08228

研究課題名(和文)フラボノイドの作用起点である細胞膜の役割と多彩な細胞保護効果の発現機構の解明

研究課題名(英文)The role of cell membrane in cytoprotective effects of flavonoids

研究代表者

松島 充代子(Matsushima, Miyoko)

名古屋大学・医学系研究科(保健)・講師

研究者番号：10509665

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：フラボノイドは野菜や果物に多く含まれ、さまざまな細胞保護作用がある。これまでに我々はフラボノイドのひとつであるケルセチンがNrf2-HO-1の活性化を通して細胞保護作用を示すことを明らかにした。本研究ではフラボノイドの作用機序として、細胞が最初に外界から刺激を受ける細胞膜、特に脂質ラフトに注目し、ケルセチンの細胞保護作用における細胞膜変化の関与について検討した。その結果、ケルセチンは細胞膜内のコレステロールを減少させることで細胞膜の構造変化が誘導することが明らかとなった。また、これによりcaveolin-1とNrf2が細胞膜から核へと移行し、HO-1の発現誘導を引き起こす可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Flavonoids, which are contained in fruit and vegetables, exhibit wide variety of cytoprotective effects. We previously reported that quercetin exerted various cytoprotective effects via nuclear factor E2-related factor 2 (Nrf2)-heme oxygenase (HO)-1 pathway. In this study, we focused on cell membrane, which is the first line to interact with extracellular environment and plays an important role in cellular signaling, and investigated the involvement of cell membrane changes in quercetin-induced cytoprotective effects. We showed that quercetin changed the formation of lipid rafts by depleting cholesterol from cell membrane. The expression levels of caveolin-1 and Nrf2 localized in cell membrane were also decreased, and caveolin-1-Nrf2 complex was translocated to cytosol and nucleus. These findings suggested that translocation of caveolin-1-Nrf2 complex to nucleus might lead the induction of HO-1.

研究分野：免疫学

キーワード：フラボノイド 細胞膜 heme oxygenase-1 Nrf2 caveolin-1

### 1. 研究開始当初の背景

フラボノイドは主に野菜や果物に存在する天然の機能性成分で多彩な細胞保護作用を示す。我々はこれまでにフラボノイドの多彩な細胞保護作用について肥満細胞の抗アレルギー作用(Matsushima et al., *Inflammation Res.* 58: 705, 2009; Matsushima et al., *Inflammation*. 32: 99, 2009)、活性酸素による肺胞上皮細胞の傷害の抑制(Hayashi et al., *BBRC* 417: 169, 2012)、線維芽細胞での膠原線維増生の抑制(Nakamura et al., *Am J Respir Cell Mol Biol* 44: 614, 2011)などを研究し、フラボノイドが誘導する heme oxygenase (HO)-1 による抗炎症作用が大きく関与していることを明らかにした。HO-1 は Nrf2 (nuclear factor erythroid 2-related factor 2)により誘導されるが、Nrf2 は生体に本来備わる重要な防御機構に関わる転写因子で、ストレスを感知し生体応答を起こす、いわば細胞内のストレスセンサーとして働き、Keap1 (Kelch-like ECH-associated protein 1)分子の制御を受けている(Keap1-Nrf2 システム)。これまでに Nrf2 を活性化し HO-1 などの誘導を通して細胞保護作用をもたらすフラボノイドについて報告し、生体にとって無害なフラボノイドは細胞に障害を及ぼすような実際のストレスではなく“ストレスミミック”な刺激により、細胞の防備体制として Nrf2 の活性化をさせると考えた。フラボノイドが活性化状態を修飾する MAPK 系をはじめ、Nrf2-HO-1 の活性化の分子機構は不明であったが、フラボノイドの多彩な細胞保護効果を考えると、共通した作用起点があり、細胞が外界と接する最初の間である細胞膜に Nrf2 の活性化も含むフラボノイドの作用標的があると考えられる。つまり、フラボノイドは細胞膜への作用を通して本来ならストレス刺激で誘導されるような防御機構をストレスフリーに誘導し保護効果を発揮すると考えた。先行研究でフラボノイドの細胞膜への作用を検討するうちに代表的なフラボノイドであるケルセチンが細胞膜構成タンパク質である caveolin-1 (Cav-1)分子の局在を細胞膜から細胞質や核へ変化させることを見出している(H23-H24 科学研究費補助金 若手(B) 課題番号 23790292)。Cav-1 は細胞膜の脂質ラフト内にカベオラを形成する際の必須のタンパク質で、この部位にあるコレステロールと結合している。Cav-1 は細胞質側で Nrf2 と結合し、Nrf2 を細胞膜に留めることで HO-1 などの酸化酵素の発現誘導を抑制していることが報告された(Volonte, D. et al. *Mol Biol Cell* 24: 1852-1862, 2013; Li, W. et al. *J Biol Chem* 287: 20922-20930, 2012)。フラボノイドの魅力である多彩な細胞保護効果の作用起点として細胞膜の作用標的が明らかになれば、その標的分子機構を修飾することにより正負いずれの方向にも細胞機能を調節するツールを得られる可能性がある。

### 2. 研究の目的

フラボノイドの多彩な細胞保護作用の発揮には共通した基盤となる作用起点として、細胞が外界と接する細胞膜に根幹となる作用標的があると考え、本研究ではフラボノイドの作用標的として細胞膜の Cav-1 および結合し共存する Nrf2 の活性化を指標として、フラボノイドの多彩な細胞保護効果の発現機構における細胞膜の役割について解明することを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) 細胞培養

細胞はマウス線維芽細胞株 NIH3T3 細胞を用いた。NIH3T3 細胞の培養には 10%FBS (fetal bovine serum)、100 U/ml non-essential amino acids、100 U/ml antibiotic-antimycotic、100 U/ml sodium pyruvate を添加した DMEM を使用した。

#### (2) Quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR)

合成した cDNA の各遺伝子の probe を用いて、Thermal Cycler Dice Real Time System II (TAKARA)を使用し、95 30 秒、95 5 秒、60 30 秒を 45 サイクル行った。内部標準物質には *Gapdh* を使用し、各遺伝子の相対的発現量を算出した。

#### (3) Western blotting

20 µg に調整した蛋白質を SDS-PAGE で分離し、polyvinylidene difluoride (PVDF)メンブレンに転写した。1 時間ブロッキングした後、1 次抗体を反応させた。洗浄後、西洋ワサビペルオキシターゼ標識抗ウサギ IgG 抗体あるいは抗マウス IgG 抗体を 1 時間反応させ、目的の蛋白質を化学発光にて検出した。

#### (4) 免疫蛍光染色

細胞を LabTek チャンバー スライド (Thermo Scientific)中で培養し、ケルセチンと共に 1, 2, 4 時間インキュベートした。スライドは固定後、1 次抗体と 4 時間で晩反応させた後、PBS で洗浄し、スライドを室温で 3 時間、蛍光標識された 2 次抗体と共に反応させた。4', 6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride (DAPI) (Vector)により核染色を行い、共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察した。

#### (5) ショ糖密度勾配遠心法による脂質ラフト分画の分離

NIH3T3 細胞を 1 ml の lysis buffer (25 mM Tris-HCl pH7.5、150 mM NaCl、2 mM CaCl<sub>2</sub>、5 mM MgCl<sub>2</sub>、1% Triton-X -100、プロテアーゼ阻害剤カクテル)に懸濁し、超音波処理後、サンプルを氷上で 30 分間インキュベートした。次いで試料に 8%スクロース溶液 1 ml を混合し 2 ml の 40%スクロースとし、5.5 ml の 30%スクロースおよび 3.5 ml の 5%スクロー

スを重層した。39,000 rpm で 22 時間超遠心し、上層から 1 ml ずつ分画を回収した。得られた各分画は蛋白質を抽出し、western blotting および薄層クロマトグラフィーに供した。

#### (6) 核分画および細胞質分画の抽出

Nuclear and Cytosolic Protein Extraction Kit (Dualsystems Biotech)を用いて行った。回収した NIH3T3 細胞( $1 \times 10^8$  細胞)に 1 mM DTT、プロテアーゼ阻害剤カクテルを含む cell lysis buffer を加え、10 分間インキュベートした後、攪拌し 500 g で 7 分間遠心し、得られた上清を細胞質分画とした。ペレットは 3 mM DTT、protease inhibitor を含む nuclei washing buffer を 500  $\mu$ l 加え再懸濁させ 2 分間インキュベートした後、500 g で 7 分間遠心した。上清を除去し、500  $\mu$ l の nuclei lysis reagent を加えて 15 分間攪拌した後、20,000 g で 15 分間遠心し、上清を核分画として回収した。得られた核分画および細胞質分画は BCA 法により濃度を測定し、免疫沈降に供した。

#### (7) 薄層クロマトグラフィーによるコレステロールの検出

シヨ糖密度勾配遠心法により回収した分画 300  $\mu$ l に等量の 2-propanol を加え、遠心濃縮機で 100  $\mu$ l 程度になるまで揮発させた後、Bligh Dyer 法により脂質を抽出した。室温で 24 時間放置した後、3,000 rpm で 1 分間遠心した。水層を除去した後、遠心濃縮機で完全に揮発させ、CM21 (クロロホルム:メタノール = 2:1)に溶解し、マイクロシリンジを用いて薄層プレートにスポットした。展開層に溶媒(クロロホルム:メタノール:酢酸 = 94:1:5)を入れ、展開させた。薄層プレートを展開層から取り出し、乾燥後、硫酸銅溶液を均一に噴霧し、180  $^{\circ}$ C で加熱してコレステロールを検出した。

#### (8) 免疫沈降

Dynabeads protein G に PBS-T で希釈した抗ヤギ Nrf2 抗体 250  $\mu$ l を加え、4  $^{\circ}$ C で 2 時間反応させた。洗浄後、抽出した各分画を 500  $\mu$ l ずつ加え、4  $^{\circ}$ C で 24 時間反応させた。

#### (9) 統計・解析

データはすべて mean  $\pm$  S.D. で表し、統計解析は Stat View (Abacus Concept, Berkeley, CA, USA) を使用し、 $p < 0.05$  を有意と評価した。

### 4. 研究成果

代表的なフラボノイドであるケルセチンを用いて caveolin-1 の局在が変化する機序を解明することにより、フラボノイドの細胞膜への作用を検討した。また、caveolin-1 と Nrf2 の動態を評価し、caveolin-1 の局在変化による Nrf2 の活性化誘導能についても検討した。

#### (1) ケルセチンの細胞保護作用の確認

はじめにケルセチンの細胞保護作用を確

認するため NIH3T3 細胞を用いて transforming growth factor (TGF)- $\beta$  により誘導されたコラーゲン発現に対するケルセチンの効果を確認した。ケルセチンは、NIH3T3 細胞において、TGF- $\beta$  により誘導された I 型コラーゲンの発現を減少させた。次に NIH3T3 細胞において、ケルセチンによる HO-1 の mRNA および蛋白質レベルでの発現を評価した。ケルセチンによって HO-1 の発現が増強された。

#### (2) 脂質ラフトの形成に及ぼすケルセチンの影響

NIH3T3 細胞においてケルセチンが脂質ラフトの形成に影響を与えるか調べた。シヨ糖密度勾配遠心法で細胞膜を詳細に分画して Cav-1 の発現を評価することによりケルセチンによる脂質ラフトの構造変化を確認した。コントロールにおいて Cav-1 はほとんどがラフト分画に豊富に局在しているのに対し、ケルセチンまたは M $\beta$ CD 処理により Cav-1 の分布がラフト分画外まで広がった。以上の結果より、ケルセチンは脂質ラフトを破壊する可能性が示唆された。

#### (3) Cav-1 と Nrf2 の共存に及ぼすケルセチンの影響

共焦点レーザー顕微鏡により Cav-1-Nrf2 の共存を観察した。Cav-1-Nrf2 はコントロールでは細胞膜で多く観察されたが、ケルセチン処理後に Cav-1-Nrf2 は細胞膜から減少し、細胞質および核で増加した。さらに、免疫沈降を行い、Cav-1 と Nrf2 の共存を評価した。ケルセチン曝露により核分画において Cav-1-Nrf2 の相互作用が増加した。これらの結果から、Nrf2 と Cav-1 はケルセチン曝露により共に核内へと移行する可能性が示唆された。

#### (4) コレステロールの除去と HO-1 発現の誘導との関係

ここまでの結果よりケルセチンが脂質ラフトを破壊する可能性を示した。そこで脂質ラフトの破壊によって HO-1 が誘導されるかを検討した。M $\beta$ CD 曝露により mRNA および蛋白質レベルで HO-1 が誘導された。M $\beta$ CD による HO-1 の誘導はケルセチンによる HO-1 の誘導と同程度であった。これにより脂質ラフトの破壊は HO-1 の発現を誘導することが示唆された。さらに薄層クロマトグラフィーを行い脂質ラフト分画中のコレステロールの量を測定した。ケルセチンは M $\beta$ CD と同様にコレステロールを減少させた。これらの結果からケルセチンがコレステロールに作用し、脂質ラフトを破壊することにより HO-1 を誘導する可能性が示唆された。

#### (5) 各種シグナル伝達に対するケルセチンの効果

NIH3T3 細胞における Cav-1、ERK、JNK および p38 のリン酸化に対するケルセチンの効果を調べた。ケルセチンは用量依存的に

Cav-1 のリン酸化を増加させた。ERK および JNK はケルセチンによってリン酸化されたが、p38 のリン酸化は見られなかった。

本研究により、ケルセチンがコレステロールに作用し、脂質ラフトを破壊することが示された。また、ケルセチンによる脂質ラフトの破壊により、Cav-1 と Nrf2 が細胞膜から細胞質および核へ移行することにより HO-1 の発現が誘導される可能性が示された。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

##### [雑誌論文](計6件)

- (1) Kawaoka H, Yamada T, Matsushima M, Kawabe T, Hasegawa Y, Shikida M. Heartbeat signal detection from analysis of airflow in rat airway under different depths of anesthesia conditions. *IEEE Sensors Journal* 17, 14: 4369-4377, 2017. 査読有  
DOI: 10.1109/JSEN.2017.2707594
- (2) Harada N, Hasegawa Y, Ono R, Matsushima M, Kawabe T, Shikida M. Characterization of basket-forceps-type micro-flow-sensor for breathing measurements in small airway. *Microsystem Technologies*, 23 (12): 5397-5406, 2017. 査読有  
DOI:10.1007/s00542-016-3265-9
- (3) Hasegawa Y, Kawaoka H, Yamada T, Matsushima M, Kawabe T, Shikida M. Respiration and heartbeat signal detection from airflow at airway in rat by catheter flow sensor with temperature compensation function, *Journal of Micromechanics and Microengineering*, 27: 12, 2017. 査読有  
DOI: 10.1088/1361-6439/aa9595.
- (4) Ogasawara N, Matsushima M, Kawamura N, Atsumi K, Yamaguchi T, Ochi H, Kusatsugu Y, Oyabu S, Hashimoto N, Hasegawa Y, Ueyama J, Kawabe T. Modulation of immunological activity on macrophages induced by diazinon. *Toxicology*. 379: 22-30, 2017. 査読有  
DOI: 10.1016/j.tox.2017.01.014.
- (5) Shikida M., Matsuyama T., Yamada T., Matsushima M., Kawabe T. Development of implantable catheter flow sensor into inside of bronchi for laboratory animal. *Microsystem Technologies* 23 (1): 175-85, 2017. 査読有  
DOI:10.1007/s00542-015-2663-8
- (6) Yasui M., Matsushima M., Omura A., Mori K., Ogasawara N., Kodera Y., Shiga M., Ito K, Kojima S., Kawabe T. The suppressive effect of quercetin on Toll-like receptor 7-mediated activation in alveolar macrophages. *Pharmacology*. 96 (5-6): 201-209, 2015. 査読有

DOI:10.1159/000438993

##### [学会発表](計25件)

- (1) 日下部純平、小西真菜香、山本良平、山本 敦、松島充代子、川部 勤. 呼吸を使った TDM の可能性 ラット呼吸量を補正 するための指標物質の探索 . 日本薬学会第 138 回年会, 2018
- (2) Kazuko Atsumi, Miyoko Matsushima, Kanako Sasou, Tsutomu Kawabe. Analysis on signal pathway in pro-inflammatory response by diazinon. 第 46 回日本免疫学会, 2017
- (3) Miyoko Matsushima, Kazuko Atsumi, Kanako Sasou, Tsutomu Kawabe. Deteriorated amount of IC capture without CD40 on B cells. 第 46 回日本免疫学会, 2017
- (4) 渥美和子、松島充代子、小笠原名奈子、佐宗香奈子、上山 純、川部 勤. ダイアジノンは骨髄由来マクロファージを活性化させ、免疫応答を修飾する . 第 48 回日本職業・環境アレルギー学会総会・学術大会, 2017
- (5) 松島充代子、川部 勤. 農薬が免疫機能に与える影響についての基礎的検討 . 第 66 回日本アレルギー学会学術大会, 2017
- (6) 大澤磨未、高井里奈、山本良平、山本 敦、松島充代子、川部 勤. 分子標的薬のための選択的吸着剤開発 . 日本薬学会第 137 回年会, 2017
- (7) 谷畑壮磨、山本良平、山本 敦、東海林秀典、加藤祐史、下内章人、松島充代子、川部 勤. 呼吸エアロゾルを代替血液とした TDM は可能か? 日本薬学会第 137 回年会, 2017
- (8) Miyoko Matsushima, Yuto Kusatsugu, Haruka Ochi, Sayaka Oyabu, Kazuko Atsumi, Nanako Ogasawara, Tsutomu Kawabe. Involvement of localization changes of caveolin-1 in Nrf2 activation induced by quercetin ケルセチンによる Nrf2 活性化における caveolin-1 の局在変化の関与. 第 90 回日本薬理学会年会, 2017
- (9) Kazuko Atsumi, Miyoko Matsushima, Hiroki Ogiso, Haruka Ochi, Yuto Kusatsugu, Sayaka Oyabu, Nanako Ogasawara, Kazuya Takemura, and Tsutomu Kawabe. Involvement of CD40 on Immune Cells in Response to Immune Complexes. ICI, 2016
- (10) Haruka Ochi, Miyoko Matsushima, Yuka Kodera, Yuto Kusatsugu, Kazuko Atsumi, Sayaka Oyabu, Nanako Ogasawara, Kazuya Takemura, Tsutomu Kawabe. Involvement of CD40 in the Expression of Bcl6. ICI 2016
- (11) Miyoko Matsushima, Yuto Kusatsugu, Sayaka Oyabu, Haruka Ochi, Kazuko Atsumi, Nanako Ogasawara, Kazuya

- Takemura, Tsutomu Kawabe. Involvement of Caveolin-1 in Quercetin-Induced Nrf2 Activation. ICI 2016
- (12) Yuto Kusatsugu, Miyoko Matsushima, Sayaka Oyabu, Haruka Ochi, Kazuko Atsumi, Nanako Ogasawara, Kazuya Takemura, Tsutomu Kawabe. Critical Role of Selective Autophagy Adaptor Protein p62 in Quercetin-Induced Nrf2 Activation. ICI 2016
- (13) Sayaka Oyabu, Miyoko Matsushima, Aya Omura, Nanako Ogasawara, Haruka Ochi, Yuto Kusatsugu, Kazuko Atsumi, Kazuya Takemura, and Tsutomu Kawabe. Quercetin Suppressed Imiquimod-Induced Activation of Alveolar Macrophages. ICI 2016
- (14) Haruka Ochi, Miyoko Matsushima, Yuto Kusatsugu, Kazuko Atsumi, Sayaka Oyabu, Tsutomu Kawabe. Somatic hypermutation is not altered without CD40 signaling in T-B interaction. 第 45 回日本免疫学会, 2016
- (15) Sayaka Oyabu, Miyoko Matsushima, Kazuko Atsumi, Haruka Ochi, Yuto Kusatsugu, Tsutomu Kawabe. The Induction of Macrophage Activation by Diazinon. 第 45 回日本免疫学会, 2016
- (16) 大藪沙也果, 松島充代子, 草次裕人, 小笠原名奈子, 武村和哉, 越智 悠, 渥美和子, 川部 勤. 生体防御機構の誘導を指標とした有害物質の評価法の探索. 第 11 回臨床検査学教育学会学術大会, 2016
- (17) 渥美和子, 松島充代子, 小笠原名奈子, 武村和也, 越智 悠, 草次裕人, 大藪沙也果, 上山 純, 川部 勤. 農薬の環境曝露が免疫機能に及ぼす影響についての基礎的検討. 第 47 回日本職業・環境アレルギー学会総会・学術大会, 2016
- (18) 松島充代子, 川部 勤. 症状発現の推測を目的に血清 IgE を用いた I 型アレルギー検査法の検討. 第 65 回日本アレルギー学会学術大会, 2016
- (19) 谷畑壮磨, 山本良平, 山本 敦, 越智 悠, 草次裕人, 松島充代子, 川部 勤. 呼吸を使った非侵襲的 TDM - 呼吸エアロゾルの構造. 第 33 回日本 TDM 学会・学術大会, 2016
- (20) Hiroki Ogiso, Miyoko Matsushima, Aya Oomura, Haruka Ochi, Yuto Kusatsugu, Tsutomu Kawabe. The role of CD40 on immune responses against immune complex. 第 44 回日本免疫学会, 2015
- (21) Yuto Kusatsugu, Miyoko Matsushima, Aya Oomura, Hiroki Ogiso, Haruka Ochi, Tsutomu Kawabe. The involvement of autophagy on quercetin-induced Nrf2 activation. 第 44 回日本免疫学会, 2015
- (22) 草次裕人, 松島充代子, 小木曾寛希, 大村 綾, 越智 悠, 黒澤慎也, 大崎理恵, 川部 勤. ガイダンス付スパイロメーターを用いた検査法の評価. 第 10 回臨床

検査学教育学会学術大会, 2015

- (23) 越智 悠, 松島充代子, 小木曾寛希, 大村 綾, 草次裕人, 日置清香, 山本良平, 井上嘉則, 山本 敦, 川部 勤. 呼吸を用いた非侵襲的 TDM 法の探索. 第 10 回臨床検査学教育学会学術大会, 2015
- (24) 松島充代子, 小笠原名奈子, 河村奈美, 山口剛広, 高木健三, 川部 勤. 有機リン系殺虫剤による免疫応答修飾機構についての検討. 第 64 回日本アレルギー学会学術大会, 2015
- (25) 高嶋浩司, 松島充代子, 橋本克則, 佐藤光夫, 橋本直純, 長谷川好規, 川部 勤. ケルセチンのマウス ARDS モデルに対する肺保護作用. 第 55 回日本呼吸器学会学術講演会, 2015

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年月日:  
国内外の別:

○取得状況(計 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
取得年月日:  
国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

<http://square.umin.ac.jp/kawabe/index.html>

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

松島 充代子 (MATSUSHIMA, Miyoko)  
名古屋大学大学院医学系研究科・講師  
研究者番号: 10509665

### (2)研究分担者

川部 勤 (KAWABE, Tsutomu)  
名古屋大学大学院医学系研究科・教授  
研究者番号: 20378219

### (3)連携研究者

( )

研究者番号:

(4)研究協力者

( )