

令和元年6月28日現在

機関番号：42640

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K00892

研究課題名(和文)膵臓細胞の抗酸化機能を増強する食品の探索：ゼーラニンAの効果は？

研究課題名(英文) Search for Foods That Enhance Pancreatic Cell Antioxidant Function: What is the Effect of Zeylaniin A?

研究代表者

大塚 譲 (Yuzuru, Otsuka)

戸板女子短期大学・その他部局等・教授(移行)

研究者番号：20135833

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：糖尿病とかかわりのあるとされているAGEsの新しい精密分析法をLC-MS/MS等を用いて開発し、ヒトやマウスの血清中のAGEを測定したところ、AGEの種類によって食餌の影響などが異なっていた。ヒトではCMLとCELが糖尿病患者で上昇し、CML濃度はインシュリン感受性とは正の相関があることが認められた。アディポネクチン遺伝子多型などの影響も認めた。血液等にゼーラニンAを含む標品を添加したところ強いAGEs生成抑制力が認められた。CaC02細胞を用いた消化吸収実験でゼーラニンAはEllagic Acidとなって体内に取り込まれた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究によりゼーラニンAは食品として摂取した場合に、腸管から吸収され、体内で強力な抗酸化物質として働き、糖尿病で上昇すると言われているAGEsの生成を体内で抑制することが明らかとなった。また新しいAGEsの分析法の開発はAGEsと糖尿病や他の生活習慣病の関係を今後明らかにしていくツールとして様々な知見をもたらすと考えられる。糖尿病合併症が起きる原因として高血糖による糖化反応によるAGEs類の生成によるものだとも考えられている。従って本研究でゼーラニンAは合併症を予防またはその進展を遅らせることのできる食品として期待できることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：We developed a new precise analysis method using LC-MS/MS for AGEs that is related to diabetes, and measured AGE in human and mouse serum. Depending on the type of AGE, the effect of diet was different. In humans, CML and CEL were elevated in diabetic patients, and CML concentrations were found to be positively correlated with insulin sensitivity. Effects such as adiponectin gene polymorphism were also observed. When a sample containing Zeylaniin A was added to blood, a strong inhibitory effect on AGE formation was observed. Zeylaniin A was taken into the body as Ellagic Acid in absorption experiments using CaC02 cells.

研究分野：家政学

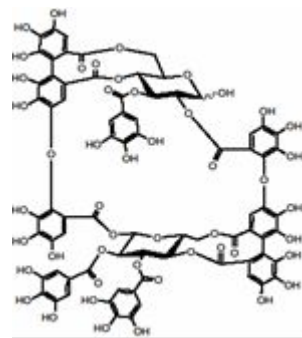
キーワード：食物学 糖尿病 AGE インスリン抵抗性 食事 血中AGE 遺伝子多型 抗酸化ポリフェノール

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 型糖尿病では、高血糖により過酸化水素が増えて酸化ストレスがたまり、もともと抗酸化酵素の発現の弱い(Robertson, 2004)ランゲルハンス島の細胞が酸化ストレスによって崩壊し、急激に糖尿病が悪化する。そこで膵臓細胞の抗酸化機構の解明と食事によるその防御を目指し、膵臓細胞における酸化ストレス時の抗酸化酵素群の発現制御機構を明らかにしてきた。ヒト膵臓細胞由来の 1.1B4 細胞を用いて過酸化水素を添加し、抗酸化酵素や各種の遺伝子の発現を DNA マイクロアレイにより分析し、抗酸化酵素ヘムオキシゲナーゼやグルタチオン合成酵素 GCLC の遺伝子発現が上昇し、スーパーオキシドジスムターゼやカタラーゼ等の主要な抗酸化酵素の遺伝子発現はほとんど変化しないことを明らかにした。従って膵臓細胞における抗酸化機構の中ではヘムオキシゲナーゼと GCLC が糖尿病による酸化ストレスから細胞を保護するうえで最も重要な抗酸化酵素であることが明らかとなった。また、オーファンレセプターである NR4A3 遺伝子の発現が上昇していた。HUC-F2 細胞でも同様の現象が認められた。そこで NR4A3 の mRNA を siRNA 法によりノックダウンしたところ、酸化ストレスに極めて弱くなっていた。それと同時にヘムオキシゲナーゼの発現も顕著に減少した。これらの結果から膵臓細胞における抗酸化機構は、酸化ストレスに対して NR4A3 転写因子が反応し、ヘムオキシゲナーゼの転写を活性化し、酸化ストレスに対抗していると推定した。[2012 年分子生物学会発表]

(2) 一方我々はベトナム栄養研究所のマイ博士らと共同で、ベトナムの食用植物の抗酸化能や生活習慣病に対する効果を調べた。各種の抗酸化活性の高い食用植物を見つけた。その中から最も強い抗酸化活性を有する TRAM という植物を選び、その抗酸化活性物質の分離精製を試みたところ、非常に強い抗酸化ポリフェノールの分離精製に成功し、NMR などにより構造決定したところ新規物質であることが判明し、ゼーラニン A と命名した(図)[J. Agric. Food Chem. 60, 10263(2012)] この物質の抗酸化活性を検討したところ、紫外線照射による細胞死を顕著に抑制することが明らかになった。ゼーラニン以外にもベトナム食用植物には強い抗酸化物質があり、抗酸化ポリフェノール、ミリシトリン等を分離精製した。



(3) 血糖値の上昇が酸化ストレスを増加させ糖尿病合併症を生む機構については十分に解明されているわけではないが、原因の一つに糖とアミノ酸のメイラード反応で生じる CEL などのいわゆる AGEs(Advanced Glycation End Products) の蓄積がある。そこで各種 AGEs を LC-MS/MS で定量する方法を開発し、糖尿病患者とそうでない健康者とでどの AGEs に変化が起きるかを比較するために新しい分析法を開発することとした。従来これらの AGEs は抗体を用いて測定されていたが、非特異的に反応するものが多く、正確には測定できないでいた。そこで非放射性同位体を内部標準とする非常に正確な AGEs 測定法を検討した。この方法で各種食品やヒトなどの血液を分析し、糖尿病患者でもマトリックスの影響があっても測定が可能であることを明らかにした。[2016 年分子生物学会発表]

2. 研究の目的

(1) これまでに糖尿病における酸化ストレスを防ぎ糖尿病合併症の悪化を食い止める薬剤、食品成分の探索が行われているが、いまだ十分な効果は得られていない。上述のように膵臓細胞では抗酸化酵素の発現が弱く、かろうじてヘムオキシゲナーゼと GCLC が酸化ストレスに反応し、抗酸化効果を発揮しているだけである。このことから膵臓細胞では、ヘムオキシゲナーゼを活性化することにより、高血糖による酸化ストレスで細胞が崩壊することを防ぐことができると考えられる。そのためには酸化ストレスに反応しヘムオキシゲナーゼの転写活性化を行うオーファンレセプターである NR4A3 を活性化する食品成分を探すことが重要であると考えている。しかしながら NR4A 群の転写調節群の反応は複雑で、NR4A3 の mRNA をノックダウンすると NR4A2 の転写が上昇し、それに伴ってもう一方の抗酸化酵素である GCLC の転写も上昇する。そこで、本研究ではまずヘムオキシゲナーゼなどの抗酸化酵素をノックダウンした細胞を作ってみることとした。そのために膵臓由来 1.1B4 細胞を用いてノックダウンし酸化ストレスに弱くなった細胞を作成しそれを救済する食品を探索できるようにする。また自然に高血糖になる系統のモデルマウスを用いた飼育実験を行い、血糖値を下げるができるか、また高血糖によるメイラード反応生成物 AGEs を減らすことができるかを明らかにする。糖尿病合併症が起きる原因は、高血糖そのものではなく、高血糖による糖化反応による AGEs 類の生成によるものだとも考えられている。従って、AGEs を直接 LC-MS/MS で測定することにより、食品成分の糖尿病合併症への効果を明らかにすることができる。

(2) また本研究ではこの細胞実験と生体による実験の 2 つの方法で膵臓細胞死を防ぎ、糖尿病合併症の進展を防止できる食品成分を探す。特に、申請者らが新規ポリフェノールとして精製し、既にある程度効果があることが示されている、ゼーラニン A やベトナム植物から見つけたポリフェノール類を最初に試すこととした。糖尿病は現在まで根治する方法は見つからないが、その合併症をできるだけ少なくすれば普通の生活が送れる。従って本研究で合併症を予防またはその進展を遅らせることのできる食品が見つければ多くの糖尿病予備軍や患者にとって良報となり、機能性食品の開発につながる。

3. 研究の方法

(1) 培養細胞系による検討と遺伝子発現等による分析

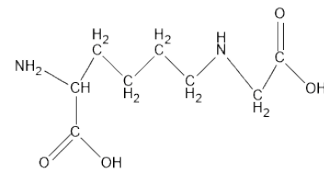
膵臓由来 1.1B4 細胞を用いて、NR4A3 や各種抗酸化酵素をノックアウトした細胞を作成しスクリーニング用の細胞を作成した。そのために NR4A3 やヘムオキシダーゼ、カタラーゼなどの siRNA を 1.1B4 細胞に添加し mRNA を精製して遺伝子発現への効果を明らかにした。リアルタイム PCR で抗酸化酵素ヘムオキシゲナーゼなどの遺伝子を測定した。

(2) 糖尿病モデル動物の作成と検討

ストレスに弱い KK-Ay マウス等を用いて糖尿病モデルマウスを作製した。予備飼育後高血糖にし、検査試料(食品成分)を与え、尿糖を随時採取測定し、糖尿病状態をモニターしながら飼育した。飼育後解剖して、血糖値を測定するとともに血液試料を採取し凍結した。また膵臓や肝臓等も同時に凍結した。インスリンやグルカゴンの抗体を用いた免疫組織化学法により膵臓の細胞の崩壊度を測定し、試料の効果を明らかにした。インスリンなどの抗体による染色は比較的簡単であるが、膵島の発育にかかわる PDX1 や転写調節因子 NR4A3、NR4A2 は発現量が少ないが、抗体による染色を行った。

(3) AGEs の測定法の確立

AGEs の分析は QTRAP 5500 (AB Sciex) または Shimadzu LCMS-8030 システムを用いた LC-MS/MS で行った。分離カラムには Intrada Amino Acid (Imtakt 社製)を用いた。Carboxymethyllysine (CML: 図) や carboxyethyllysine (CEL), methylglyoxal-derived hydroimidazolone (MG-H1) などの 7 種の AGEs を測定した。サンプルとして、4 名のボランティアから提供された全血及び血漿を用い、遊離型 AGEs および結合型 AGEs を分析した。結合型 AGEs を測定するための加水分解法として HCl または酵素を用いて処理し、両者を比較した。



また、ゲル濾過クロマトグラフィー (GPC) を用いて加水分解後の試料の分子量分布をもとに加水分解条件の影響を検討した。

さらに HCl 加水分解処理での血液中に含まれる糖との新たな反応による AGEs 生成への影響を調べるため、Glc と Lys あるいは Arg を HCl で加熱処理し、AGEs の生成を調べた。液体食品として市販コーヒー飲料や緑茶飲料等を、N2 置換下 12N HCL またはソナリーらの酵素法を用いて直接加水分解処理し、AGEs を測定して加水分解法の比較を行った。固形食品サンプルとして、食パンと菓子パン用パンの 2 種とそれぞれ焼く直前の生地を用いた。

(4) ヒトの血液中の AGEs の測定

研究対象は、福岡県労働衛生研究所 (FIOH) で定期健康診断を受けた 40~60 歳の日本人男性 148 人で、調査の書面による説明を受けた後、全参加者からインフォームドコンセントを得た。臨床マーカー、年齢、身長、体重、胴囲、血清トリグリセリド、総コレステロール (TC)、高密度リポタンパク質コレステロール (HDL-C)、血糖値、ヘモグロビン A1c (HbA1c)、総タンパク質 およびアルブミンは、FIOH で測定された。生化学的測定 空腹時の血液サンプルを FIOH での生化学アッセイ用にチューブに吸引した。遊離 AGEs は凍結保存した全血を解凍した後、LC-MS / MS で能見らの方法で分析した。また鳥取大学医学部でもインフォームドコンセントを得て同様の分析を行った。

(5) 新規植物の採取、食品成分の分離と構造決定

日本に留学してお茶の水女子大学や日本女子大学で博士の学位を受けるなどして帰国したベトナム栄養研究所のマイ博士、チュー博士より試料の提供を受け各種食品成分を分離精製し、構造決定を行った。

4. 研究成果

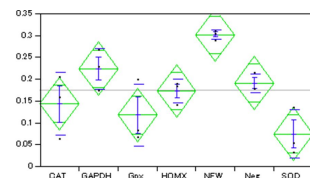
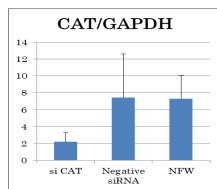
(1) 各種抗酸化遺伝子等ノックダウン細胞の作製

SOD1、CAT、Gpx1、ヘムオキシゲナーゼの siRNA を添加してから 24 時間後に各遺伝子の発現量を測定した。CAT (図) と Gpx1 ではほぼ完全にノックダウンすることができたが、ヘムオキシゲナーゼと SOD1 ではそれぞれの遺伝子をノックダウンすることができなかった。NR4A3 ではノックダウン細胞を作ることができた。これらの細胞に酸化ストレスを与え、その細胞の生育を測定した。その結果 CAT と Gpx1 ノックダウン細胞では酸化ストレスに弱くなっていたが、ヘムオキシゲナーゼではその効果は認められなかった(図)。

この結果から細胞を用いたスクリーニング系を作成することは困難であると考え、動物実験を行うこととした。

(2) AGEs の精密分析法の確立

生体における実験を行う前に、AGEs の分析方法を確立した。従来用いられてきた抗体による測定法に代わる正確に AGE 類を測定する新しい分析法を LC-MS/MS およびアミカラムを用いて開発し、遊離の CML などの AGE 類を N15 内部標準を用いればマトリックスの影があっても正確に分析できることを明らかにした。そこで醤油などの食品中の遊離 AGE 類をこの方法を用いて測定し、醤油の種類、製造後の保存状態などにより変化することを明らかにした。(J Agric Food Chem. 2016 Nov 9;64(44):8397-8405.) 次にこの方法でヒト血清中の遊離 AGE 類の分析を行う

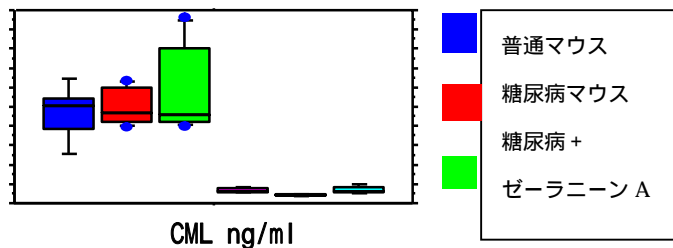


方法を開発した。血清によるイオン化効率が AGE の種類によって異なることが判明したので、食品と同様 N15 同位体 CML などを内部標準とすることで正確に測定する方法を開発した。

結合型 AGE 類の測定法を確立するために、酸加水分解法と酵素法を比較した。生体内や食品中に遊離型と結合型の AGE が存在するので、遊離型に加え、結合型の測定法を確立する必要がある。そのために、酸加水分解法と酵素法を比較した。全血酸加水分解物と酵素分解物の HPLC を比較したところ、酸加水分解では分解の不十分な物質が検出されたところから結合型の測定には酵素法のほうが優れていると考えられた。

(3) 生体中における遊離 AGE 類の分析

抗酸化物質の糖尿病への効果を明らかにするために動物実験を行った。遺伝的に 2 型糖尿病を発症するマウスにベトナムの食用植物 Tram から精製したポリフェノールのゼーラニン A を 10 日間投与し、糖尿病に対する効果を検討した。(図) その結果、高血糖や AGEs に対する



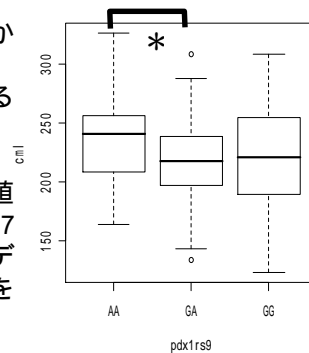
ゼーラニンの効果は無かったが、自由摂取と絶食時のマウスの血清で AGE の比較を行ったところ、それぞれに有意差があった。また使用するマウスの種類や年齢、食餌などによる影響があることが分かった。ゼーラニン A を長期間投与するだけの量がなかったので、同じベトナムの食用植

物 Hirta や Voi を 3 週間投与すると、血中 CML などに低下傾向が認められた。(三原 2016 分子生物学会発表) 食事の影響を見るために絶食後、経時的に糖尿マウスより、採血し、AGE を測定したところ、AGE の種類によって、血中濃度の変化が異なっており MG-H1 は食後急速に減少し、食事の影響が考えられた。またヒトの血液成分で AGE の測定値に違いがあるかどうかを全血と血漿を用いて検討した。血液の分画によって違いが認められた。

この方法を用いて、糖尿病患者と非糖尿病患者の血清 AGE を測定するとともにグルコースクランプ法によりインスリン抵抗性を測定したところ、CML と CEL が糖尿病患者で上昇し、CML 濃度はインシュリン分泌と負の相関を、またインシュリン感受性とは正の相関があることが認められた。(J. Diabetes Res. Vol 2017, Article ID 5139750) このことから、生体内遊離 AGE は生活習慣病である糖尿病に密接に関係していることが、明らかになった。

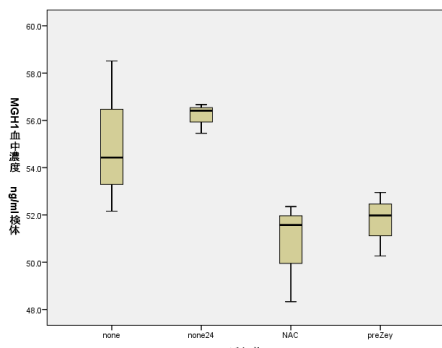
(4) ヒト血中遊離 AGEs の分析

次にヒトの血清と全血等で各遊離 AGE の測定値に違いがあるかどうか、食事の影響があるか 10 人のボランティアの血液で検討した。その結果、食事の内容や、食後の状態によって、差が出るようになった。また 148 人の血液と遺伝子、食事の影響について調べ、中華料理や、遺伝子多型などが、血中遊離 AGE に影響することを認めた。PDX1 rs9581943 の AA 型では、CML の値が高書く、AA 型の LEP では、GH1 の値が低かった。(図、宮本 2017 分子生物学会発表) ボランティアによる実験で食事の状態やアディポネクチン遺伝子多型などが、血中遊離 AGE に影響することを認めた。

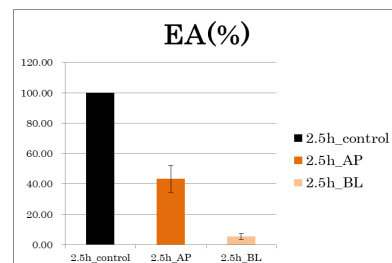


(5) ヒト細胞によるゼーラニン A の効果の分析

動物実験より簡便にゼーラニンの効果などを測定するためにヒト膵臓細胞由来 1.1B4 細胞を培養し、NR4A3 や NR4A1 の転写活性化を測定した。H2O2 添加から 24 時間後の細胞生存率を MTT assay にて測定した。1.1B4 細胞は 100 μM H2O2 の添加により、生育が抑制された。ゼーラニン A 処理をした細胞においても、同様に H2O2 による生育阻害が見られ、ゼーラニン A 25 μM まででは、細胞増殖の回復は見られなかった。しかしゼーラニン A はインスリン遺伝子の発現を濃度依存的に上昇させた。酸化ストレスによって脆弱した膵島への機能回復効果が示唆された。(山田 2012 農化関東発表)



次に血液にゼーラニン A を含む標品を添加し、AGEs の生成量をどのくらい抑えるかを調べたところ、代表的な抗酸化物質 NAC と同等の抑制力が認められた(図)。食事としてゼーラニン A を摂取しても消化吸収されなくては効果がないと思われるところから、小腸上皮



細胞モデル CaCO2 細胞を用いてモデル腸管組織を作って消化吸収実験を行ったところ、ゼーラニン A は少量ではあるが、Ellagic Acid となって体内 (BL 基底膜側) に取り込まれ強い抗酸

化作用を示すことが明らかになった(図)。

4.5. 結論

これらのことからゼラニン A は食品として摂取した場合に、腸管から吸収され、体内で強力な抗酸化物質として働き、糖尿病で上昇すると言われている AGEs の生成を体内で抑制することが明らかとなった。

<引用文献>

Nomi, Y. Shimizu, S. Sone, Y. Tuyet, M. T. Gia, T. P. Kamiyama, M. Shibamoto, T. Shindo, K. Otsuka, Y. "Isolation and antioxidant activity of zeylaniin A, a new macrocyclic ellagitannin from Syzygium zeylanicum leaves", J. Agric. Food Chem.60,10263(2012).

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 4 件)

1. Nomi Y, Annaka H, Sato S, Ueta E, Ohkura T, Yamamoto K, Homma S, Suzuki E, Otsuka Y. "Simultaneous Quantitation of Advanced Glycation End Products in Soy Sauce and Beer by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry without Ion-Pair Reagents and Derivatization." J Agric Food Chem. 2016 Nov 9;64(44):8397-8405. Epub 2016 Oct 31. PMID: 27771957 DOI: 10.1021/acs.jafc.6b02500
2. Tsuyoshi Okura, Etsuko Ueta, Risa Nakamura, Yohei Fujioka, Keisuke Sumi, Kazuhisa matsumoto, Kyoko Shoji, Kazuhiko Matsuzawa, Shouichirou Izawa, Yuri Nomi, Hitomi Mihara, Yuzuru Otsuka, Masahiko Kato, Shinichi Taniguchi and Kazuhiro Yamamoto. "High serum advanced glycation end products are associated with decreased insulin secretion in patients with type 2 diabetes." Journal of Diabetes Research Volume 2017, Article ID 5139750, 7 pages <https://doi.org/10.1155/2017/5139750>
3. 大塚 譲, 上田 悦子, 能見祐理. 「AGEs の精密分析と食品化学, 医学への応用 - AGEs の精密分析により新しい事実が明らかに。」 化学と生物 Vol.56 No.4 Page. 242 - 243 (published date : 2018 年 3 月 20 日)
4. 曾根保子, 藤田 宏美, 大塚 譲, 上田 悦子. 「健康管理能力や疾病予防知識の育成に及ぼすヒトの遺伝情報を活用した高等学校専門教科「家庭」授業の効果」日本家政学会誌 69(11):746-756, 2018. <https://doi.org/10.11428/jhej.69.746>

[学会発表](計 7 件)

1. 三原 瞳, 上田 悦子, 大倉 毅, 山本 一博, 能見 祐理, 新藤 一敏, 三浦 豊, 田代 紅, 大塚 譲. 「LC-MS/MS による AGEs の分析と糖尿病における変化。」日本分子生物学会 2016 年 横浜。
2. 三原瞳, 上田悦子, 能見祐理, 大倉毅, 山本一博, 大塚譲. 日本食品分析学会 2017 年 東京。
3. 宮本 紅, 三原 瞳, 上田 悦子, 能見 祐理, 大倉 毅, 山本 一博, 河原 和夫, 大塚 譲. 「ヒト血液中の AGEs の分析。」日本分子生物学会 2017 年 神戸。
4. 三原 瞳, 宮本 紅, 上田 悦子, 藤田 宏美, 能見 祐理, 大倉 毅, 山本 一博, 河原 和夫, 大塚 譲. 「血中 AGEs に及ぼす食事の影響。」日本分子生物学会 2017 年 神戸。
5. 上田悦子, 藤田宏美, 大塚 譲. 「大学入学時の消費者教育が学生の生活に及ぼす効果」日本家政学会 2018 年 東京。
6. 宮本紅, 田野倉美里, 上田悦子, 能見祐理, 大倉毅, 山本一博, 大塚譲. 「結合型 AGEs の分析方法の検討および食品中の AGEs 分析。」食品分析学会 2018 年 東京。
7. 宮本 紅, 田野倉 美里, 上田 悦子, 能見 祐理, 大倉 毅, 下廣 寿, 北尾 苑子, 伊藤 祐一, 山本 一博, 大塚 譲. 「結合型 AGEs の分析方法の検討およびヒト血液中の AGEs 分析。」日本分子生物学会 2018 年 横浜。

[その他]

1. ひらめき ときめきサイエンス~ようこそ大学の研究室へ~KAKENHI「お米の遺伝子(DNA)を分析してみよう!」2017 年 8 月 東京 戸板女子短期大学。

2. ひらめき ときめきサイエンス～ようこそ大学の研究室へ～KAKENHI「豚の遺伝子（DNA）を分析し肉質への影響を調べよう」 2018年8月 東京 戸板女子短期大学。

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：上田 悦子

ローマ字氏名：UETA, Etsuko

所属研究機関名：鳥取大学

部局名：医学部

職名：講師

研究者番号（8桁）：40335526

研究分担者氏名：能見 祐理

ローマ字氏名：NOMI, Yuri

所属研究機関名：新潟薬科大学

部局名：応用生命科学部

職名：助教

研究者番号（8桁）：20614887

研究分担者氏名：三原 瞳

ローマ字氏名：MIHARA, Hitomi

所属研究機関名：戸板女子短期大学（現聖徳大学）

部局名：食物栄養科（現人間栄養学部）

職名：助手

研究者番号（8桁）：20774631

研究分担者氏名：宮本 紅

ローマ字氏名：MIYAMOTO, Kurenai

所属研究機関名：戸板女子短期大学

部局名：食物栄養科

職名：助手

研究者番号（8桁）：20831134

(2)研究協力者

研究協力者氏名：柴本崇行

ローマ字氏名：SHIBAMOTO, Takayuki

研究協力者氏名：田野倉美里

ローマ字氏名：MISAT, Tanokura