

平成 22 年 3 月 31 日現在

研究種目：基盤研究 (B)  
 研究期間：2007～2009  
 課題番号：19380075  
 研究課題名 (和文) 食事性フラボノイドの代謝変換と酸化ストレス制御機能相関  
 研究課題名 (英文) Relationship between metabolic conversion of dietary flavonoids and their functions on oxidative stress  
 研究代表者  
 寺尾 純二 (TERAO JUNJI)  
 徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・教授  
 研究者番号：60093275

研究成果の概要 (和文)：野菜果実に普遍的に含まれる抗酸化フラボノイドであるケルセチンを主な対象として、摂取後の代謝変換機構と酸化ストレス制御機構の関係を明らかにすることを試みた。血流中に存在するケルセチン抱合体代謝物は活性化マクロファージ様細胞による脱抱合反応を介して強い抗酸化活性を発揮した。ストレス負荷状態の血管内膜および中枢神経系においてフラボノイドはアグリコンに変換することにより酸化ストレスを効果的に抑制することが示唆された。

研究成果の概要 (英文)：This study was aimed to clarify the relationship between metabolic conversion of dietary flavonoids and their functions on oxidative stress control using quercetin, an antioxidative flavonoid ubiquitously present in fruits and vegetables. The results indicate that conjugated quercetin metabolites exert a powerful antioxidant activity after deconjugation via activated macrophage-like cells. It is likely that dietary flavonoids are helpful in the suppression of oxidative stress occurring in the target sites of intima and CNS by converting to their aglycone under stress-loaded state.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	7,800,000	2,340,000	10,140,000
2008年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2009年度	2,300,000	690,000	2,990,000
年度			
年度			
総計	12,400,000	3,720,000	16,120,000

## 研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・食品科学

キーワード：フラボノイド、酸化ストレス、ケルセチン、血管内皮細胞、動脈硬化、神経細胞、パーキンソン病、セロトニン

## 1. 研究開始当初の背景

野菜果実や穀類豆類等の植物性食品に含まれるフラボノイド化合物は強い活性酸素 (ROS) 捕捉消去作用を有することから、酸化

ストレスが関わる動脈硬化や神経変性疾患などの疾病予防に有効である可能性が指摘されている。事実、培養細胞実験や動物実験ばかりでなく、疫学研究においてもフラボ



ノイド摂取が心疾患や神経変性疾患予防に寄与することが強く示唆されている。しかし、フラボノイドの生理機能としての抗酸化活性の意義はいまだに明確ではない。一方、フラボノイドの生理機能として注目されつつある細胞内情報伝達系に対する作用に関しても酸化ストレスが関わる細胞内レドックスを介在する可能性が高い。したがって、フラボノイドの抗酸化作用にはROSに対する直接的な捕捉消去活性とともに細胞内レドックスを含めて評価する必要がある。さらに重要な点は、食事由来フラボノイドの生理機能評価にはその生体吸収性および代謝変換率を考慮しなければならないことである。私たちは代表的なフラボノイドであるケルセチンとエピカテキンの生体吸収および代謝機構の解析を行い、数種類のグルクロン酸・硫酸抱合体代謝物を同定するとともに、小腸上皮における吸収代謝機構に新たな知見を得た。さらに2004・2006年度に実施した科研費基盤研究(B)において、ケルセチンの食品存在形態である配糖体の代謝変換と組織への蓄積および抗酸化活性評価を行い、血管大動脈にケルセチン抱合体代謝物が蓄積して抗酸化活性を発現することを世界に先駆けて発表した。そこで本研究では、動脈硬化および神経変性疾患の発症抑制をターゲットとして、フラボノイドの代謝変換と酸化ストレス制御の構造活性相関を明らかにすることを目的とした。すなわち、細胞レベルでケルセチン代謝産物の酸化ストレス制御活性を詳細に評価することにより、抗動脈硬化作用および抗神経変性作用を担う真のフラボノイド活性代謝産物を明らかにすることをめざした。

## 2. 研究の目的

本研究は食事から摂取した抗酸化フラボノイド代謝産物の生理機能を細胞レベルで詳細に評価しようとするものである。とくに食生活との関係が深いとされる「動脈硬化症」「神経変性症」の発症機構の一端にフラボノイド代謝物が作用して抑制機能を発現することを明らかにしたい。そのために以下の4項目を研究目的として設定した。

(1) ケルセチンおよびその他のフラボノイドの血中代謝産物を化学合成して一連の代謝物ラインアップを作成する。

(2) 代謝産物の疎水性や還元力、ROSとの反応性を測定し、構造活性相関を評価する。

(3) 代謝物の血管系細胞および中枢神経系細胞における酸化ストレス制御作用を評価する。

(4) 代謝物の血流中での存在状態を明らかにするとともに、血流から標的部位への移行メカニズムを解明する。

## 3. 研究の方法

### (1) 代謝物の合成

ケルセチンのヒト血中代謝産物を同定するとともに主要代謝産物を化学合成して一連の代謝物ラインアップを作成した。

### (2) 血管細胞系での評価

培養ヒト血管内皮細胞(HUVEC)を用いて、内皮細胞誘導酸化LDL生成に対するケルセチン代謝物および関連化合物の抑制作用を比較検討した。

### (3) 神経細胞系での評価

培養マウス神経細胞(Neuro2A)を用いて過酸化水素および6-ヒドロキシドーパミン刺激による細胞内酸化ストレスに対するケルセチン代謝物および関連化合物の抑制作用を比較検討した。

### (4) 標的部位への移行プロセスの解明

各種刺激剤によるケルセチン代謝物の内皮細胞透過性を二層系のtranswell plateで測定した。マクロファージ細胞(RAW264)を用いて血管マクロファージへの取り込みと代謝変換を検討した。神経系においてはNeuro2A細胞とともにミクログリア細胞(MG6)への取り込みや代謝変換を追跡することにより、中枢神経系における標的部位への移行プロセスを推定した。

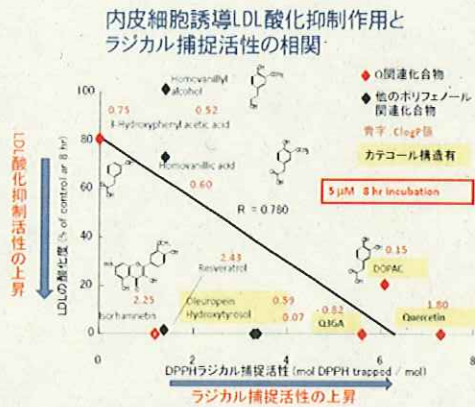
## 4. 研究成果

(1) ケルセチンについてマクロファージにおける代謝変換プロセスを検討した。リポポリサッカライド刺激マクロファージでは脱抱合体化反応によりケルセチンのグルクロン酸代謝物からアグリコンが生成するとともに、さらにイソラムネチンにメチル化される経路が活性化されることを明らかにした。メチル化反応によりケルセチンのラジカル捕捉活性は減弱したが、酸化LDLスカベンジャー受容体の発現抑制作用が生じることが示唆された。エピカテキンにおいては、エピカテキン抗体を作成する過程でエピカテキンガラートを特異的に認識する抗体が得られた。本抗体によりマクロファージ由来の泡沫細胞が局在するヒト動脈硬化巣にエピカテキンガラートが蓄積することがみとめられた。

(2) 血管内皮細胞誘導LDL酸化実験において、ケルセチンアグリコンおよびその3位-グルクロン酸代謝物(Q3GA)が酸化抑制作用を発揮することを確認した(図-1)。一方、3位がメチル化されたイソラムネチ

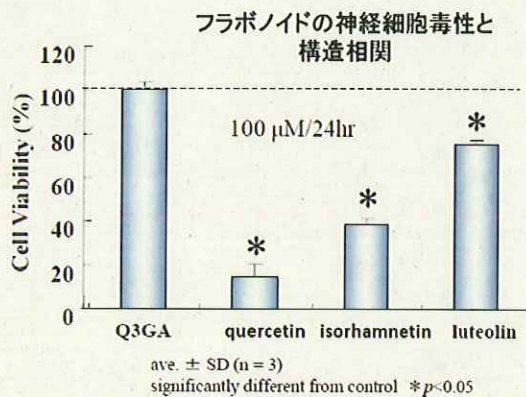


ンは抑制しなかった。また腸内細菌による分解代謝産物では3, 4-ジヒドロキシフェニル酢酸に強い抑制活性がみられた。これらの結果から抑制活性に疎水性は影響しないが、カテコール構造は必要であることが明らかになった。



(図-1)

- (3) ROS発生の一因であるミエロペルオキシダーゼ反応のフラボノイド類による阻害活性を検討し、阻害活性には個々のフラボノイドのラジカル捕捉活性とともにlogPで表される疎水性が関係することをみとめた。
- (4) ケルセチンは神経細胞 Neuro2A に対して細胞毒性を示したが、Q3GAには毒性作用はみられなかった。ルテオリンの場合にはその毒性作用はケルセチンに比べて弱い傾向がみとめられた (図-2)。



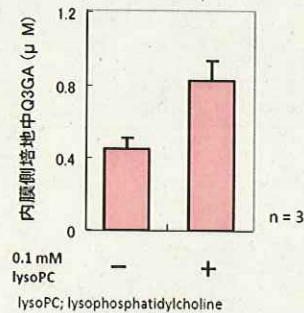
(図-2)

ケルセチンアグリコンは単位間で細胞内に取り込まれるがQ3GAの取り込み速度は遅く、24時間で最大に達したが、その量は少なかった。した

がって、ケルセチンの抱合体化反応は細胞への取り込みを低下させるが、ケルセチンの毒性を抑えて効果的に酸化ストレス抑制活性を發揮させる経路であると推測された。

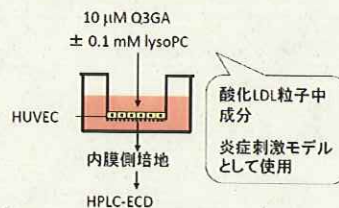
- (5) 血管内皮細胞実験において血漿アルブミンに結合したQ3GAは容易にアルブミンから遊離し、その一部は内皮下へ透過することを明らかにした (図-3)。その透過は酸化LDLに含まれるリゾホスファチジルコリンの刺激で増強された。一方、アグリコンは遊離せず、したがって透過されないことから血流中のケルセチンが内皮下で作用するためには抱合体代謝物として存在する必要があると思われた。

Transwell 培養HUVECにおけるQ3GAの透過量 (1 hr incubation)



Q3GAの血管内皮細胞透過性について検討

●transwell plate実験系

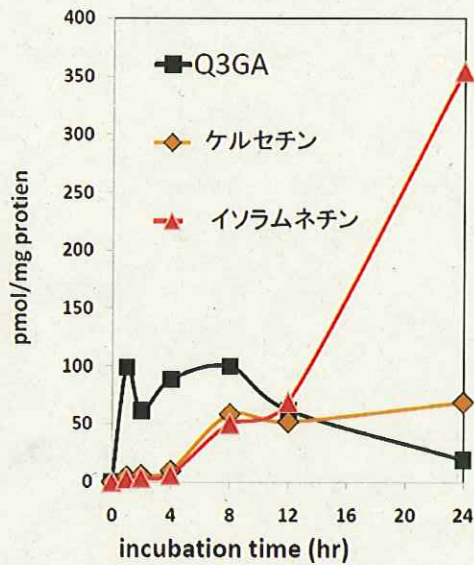


(図-3)

- (6) 中枢神経系におけるマクログリア細胞であるミクログリア細胞ではケルセチン代謝物の脱抱合体であるアグリコンの生成と取り込みが観察されたことから、中枢神経系においてもケルセチン代謝物の脱抱合体化が起こる可能性が示された (図-4)。



マウスミクログリア細胞MG6における  
Q3GAの取り込みと脱抱合



(図-3)

- (7) ケルセチンを7日間経口摂取させるとケルセチン代謝物の脳内蓄積がみられることを確認した。連続的な強制水泳試験によりマウスに精神ストレスを負荷すると脳ミトコンドリア画分のモノアミンオキシダーゼ-A(MAO-A)活性が上昇するとともに脳内酸化ストレスも亢進することを明らかにした。脳内蓄積したケルセチン代謝物は精神ストレスに由来する酸化ストレスを抑えることにより抗ストレス作用を発揮すると考えられた。

#### 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 7 件)

- ① Kawabata K, Kawai Y, Terao J. Suppressive effect of quercetin on acute stress-induced hypothalamic-pituitary-adrenal axis response in Wistar rats. *J. Nutr. Biochem.* 査読有 21:374-380:2010.
- ② Terao J. Dietary flavonoids as antioxidants. *Forum Nutr.* 査読無 61:87-94:2009.
- ③ Murakami A, Ashida H, Terao J. Multitargeted cancer prevention by quercetin (review). *Cancer Lett.* 査読

有 269:315-325:2008.

- ④ Kawai Y, Tanaka H, Murota K, Naito M, Terao J. (-)-Epicatechin gallate in foamy macrophages in human atherosclerotic aorta: Implication in the anti-atherosclerotic actions of tea catechins. 査読有 *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 374:527-532:2008.
- ⑤ Kawai Y, Nishikawa T, Shiba Y, Saito S, Murota K, Shibata N, Kobayashi M, Kanayama M, Uchida K, Terao J. Macrophages as a target of quercetin glucuronides in human atherosclerotic arteries: Implication in the anti-atherosclerotic mechanism of dietary flavonoids. 査読有 *J. Biol. Chem.* 283:9424-9434:2008.
- ⑥ Terao J, Kawai Y, Murota K. Vegetable flavonoids and cardiovascular disease. 査読有 *Asian Pac. Clin. Nutr.* 17:291-293:2008.
- ⑦ Shiba Y, Kinoshita T, Chuman H, Taketani Y, Takeda F, Kato Y, Naito M, Kawabata K, Ishisaka A, Terao J, Kawai Y. Flavonoids as substrates and inhibitors of myeloperoxidase: molecular actions of aglycons and metabolites. 査読有 *Chem. Res. Toxicol.* 21:1600-1609:2008.

[学会発表] (計 9 件)

- ① 大塚聖子、川畑球一、河合慶親、寺尾純二 神経細胞 Neuro2A の酸化ストレスに対するケルセチン代謝物の抑制作用 第42回日本栄養食糧学会中国・四国支部大会 21年11月8日 鳥取市
- ② 神田真衣、西川朋美、河合慶親、室田佳恵子、中馬寛、青木由典、小池泰介、寺尾純二 血管内皮細胞を介した LDL の酸化変性に対するオリブポリフェノールの抑制作用 2009年度日本農芸化学会関西・中四国・西日本支部合同大会 21年10月30日那覇市
- ③ 吉野早紀、川畑球一、徳村彰、河合慶親、寺尾純二 ケルセチン代謝物のマウス脳モノアミンオキシダーゼ A 活性抑制作用 第62回日本酸化ストレス学会学術集会 21年6月11日福岡市



- ④ Terao J, Kawai Y. Mechanistic approach to anti-atherosclerotic effect of tea catechins. International Symposium and Annual meeting of Korean Society for Food and Nutrition. Oct. 14<sup>th</sup> 2008. Jeju Island, KOREA
- ⑤ Terao J, Murota K, Kawai Y. Antioxidative flavonoids quercetin:metabolic conversion behind its anti-atherosclerotic effect. International symposium on lipid peroxidation 2008. Oct. 7<sup>th</sup> 2008. Karuizawa, JAPAN
- ⑥ Terao J, Murota K, Kawai Y. Anti-atherosclerotic effect of polyphenols:Role of metabolic conversion and transport to the target site. International Conference on Polyphenols 2008. July 9<sup>th</sup> 2008. Salamanca, SPAIN.
- ⑦ Terao J, Murota K, Kawai Y. Anti-atherosclerotic effect of vegetable flavonoids. Italian-Japanese joint symposium-National Products and functional Foods. June 28<sup>th</sup> 2008. Salerno, ITALIA
- ⑧ Terao J, Murota K, Kawai Y. Availability and behavior of dietary flavonoids in the target site. 2<sup>nd</sup> International Symposium on Translational Research on Natural Products and cancer. Dec. 11<sup>th</sup> 2007. Lanavala, Mumbai, INDIA
- ⑨ Terao J, Murota K, Kawai Y. Antioxidant activity and physiological significance of flavonoid metabolites. 9th International Conference of Antimutagenesis and Anticarcinogenesis. Dec. 5<sup>th</sup> 2007. Jeju Island KOREA

[図書] (計 1 件)

- ① Terao J. Flavonoids: Metabolism, bioavailability and health impact (in Plant Phenolics and Human Health) A John Wiley and Sons Inc. 2009. 13 ページ

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 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 0 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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

寺尾 純二 (TERAO JUNJI)  
 徳島大学・大学院ヘルスバイサイエンス研究部・教授  
 研究者番号：60093275

(2) 研究分担者

室田 佳恵子 (MUROTA KAEKO)  
 徳島大学・大学院ヘルスバイサイエンス研究部・助教  
 研究者番号：40294681

河合 慶親 (KAWAI YOSHICHIKA)  
 徳島大学・大学院ヘルスバイサイエンス研究部・助教  
 研究者番号：50380027

(3) 連携研究者

なし