

令和 4 年 6 月 24 日現在

機関番号：25301

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K20188

研究課題名(和文) ジオスゲニンの生理活性脂質合成系に対する作用機序の解明と慢性炎症予防効果の検証

研究課題名(英文) Elucidation of the mechanism of diosgenin on the bioactive lipid synthetic pathway and verification of its effect on preventing chronic inflammation

研究代表者

津嘉山 泉 (Izumi, Tsukayama)

岡山県立大学・保健福祉学部・助教

研究者番号：30823249

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：植物由来成分ジオスゲニンの生理活性脂質プロスタグランジン(PG)E2合成系酵素の抑制効果に焦点をあて、その作用機序の解明と、炎症性疾患への効果ならびに安全性の検証を行った。ジオスゲニンは、グルココルチコイド受容体を介してPGE2合成系酵素のシクロオキシゲナーゼ(COX)-2と膜結合型PGE合成酵素(mPGES)-1の発現を抑制することが示された。また、肝炎モデルマウスにおいて、マクロファージ特異的に両酵素の発現を抑制することで、肝臓の炎症を抑えることを見出した。一方で、ジオスゲニンは、血管内皮細胞のPGE2合成系には影響せず、心血管系への副作用を回避し、抗炎症効果を有することが期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

過剰なプロスタグランジン(PG)E2産生が、様々な病態の基盤になることから、疾病に関わるPGE2合成を抑制する食品機能性を探索し、科学的に実証することを目指している。本研究成果は、植物ステロールジオスゲニンの炎症性疾患への効果を示すことで、新規食品機能成分として健康長寿延伸に寄与できると考える。

研究成果の概要(英文)：Focusing on the suppression effect of the bioactive lipid, prostaglandin (PG) E2 synthetic enzymes, we examined the mechanism of action of the plant-derived component diosgenin and its effect and safety on inflammatory diseases. We demonstrated that diosgenin suppressed COX-2 and mPGES-1 via the glucocorticoid receptor. We also found that in liver injury model mouse, diosgenin suppresses liver inflammation by suppressing the expression of both enzymes, particularly in the macrophages. On the other hand, diosgenin does not affect the PGE2 synthetic pathway in vascular endothelial cells. Therefore, diosgenin is expected to have anti-inflammatory effects without any side effects on the cardiovascular systems.

研究分野：栄養生化学

キーワード：慢性炎症 植物ステロールジオスゲニン 抗炎症効果

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

わが国における死亡原因の約 50%が慢性炎症を基盤とする疾病である。 $\omega 6$ 系不飽和脂肪酸のアラキドン酸より生合成されるプロスタグランジン (PG) E_2 は、恒常性維持に働く一方で、誘導型のシクロオキシゲナーゼ (COX)-2 とミクロソーム型 PGE 合成酵素 (mPGES)-1 による過剰な PGE_2 産生の継続は、様々な炎症性疾患を導く。解熱鎮痛の目的で、COX 阻害剤の非ステロイド性抗炎症薬 (NSAIDs) が広く臨床応用されているが、その長期服用は、恒常性維持に必要なプロスタノイドの産生も抑えてしまい、胃粘膜障害などの重篤な副作用が生じる。COX-2 選択的阻害剤も、血管内皮細胞で恒常的に発現する COX-2 にも作用し、血小板凝集抑制作用のある PGI_2 を減少させることで、心血管障害の副作用を示すことが報告されている。よって、これら COX 阻害薬を、予防目的で長期服用することは難しい。そこで私達は、炎症性疾患の予防や改善のために、 PGE_2 合成系を標的とした、副作用の少ない食品機能性の探索を行ってきた。その中で、ヤマノイモ科の自然薯に、COX-2 と mPGES-1 の発現抑制効果と、炎症や腫瘍形成に対する予防や改善効果を明らかにした^{1), 2)}。また、その機能性を有する候補成分として、ジオスゲニンを見出した。ジオスゲニンは、ファイトケミカルとして知られているが、その効果は不十分な点も多い。ジオスゲニンの慢性炎症予防効果の科学的根拠と、食品としての安全性が明示できれば、健康長寿に貢献できる新規食品機能性成分としての応用が期待できる。

2. 研究の目的

植物ステロールであるジオスゲニンは、フェヌグリーク (*Trigonella foenum-graecum*) の種子や、野生のヤマノイモの根に多く含まれることが知られている。ジオスゲニンは、癌や心臓血管系の疾患や炎症など、様々な薬理活性作用が報告されているものの、炎症抑制の作用機序については十分に解明されていない。本研究では、植物ステロールジオスゲニンのグルコシルコイド (GC) 様作用を仮定し、①COX-2 と mPGES-1 の発現抑制作用を明らかにし、②炎症性疾患の予防や改善効果を検証することを目指した。

3. 研究の方法

(1) 細胞および動物

癌と炎症のモデル細胞として、ヒト非小細胞肺癌 A549 細胞とマウスマクロファージ様 RAW264 細胞を用いた。疾病モデル動物に、グラム陰性菌リポ多糖 (LPS) 誘発急性肝障害モデルマウスと、メチオニン・コリン欠乏 (MCD) 食摂餌による非アルコール性脂肪性肝炎 (NASH) 様モデルマウスを使用した。

(2) タンパク質発現解析

A549 細胞ホモジネート (10,000xg 上清) を用いて、COX-2 と mPGES-1 のタンパク質発現動態を、ウェスタンブロットにより解析した。

(3) 定量 RT-PCR による遺伝子発現解析

細胞あるいはマウス肝臓より total RNA を抽出し、逆転写反応により cDNA を作成した。この cDNA を鋳型として各遺伝子に対する特異的プライマーを用いて、SYBR green real-time PCR の $\Delta\Delta Ct$ 法により遺伝子の発現量を比較定量した。内在性コントロールには、glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (*GAPDH*) を用いた。

(4) 免疫細胞化学解析

A549 細胞を 4%パラホルムアルデヒドと 0.5%エタノールで固定した後、NF- κ B の特異的抗

体を用いて免疫染色を行った。

(5) 病理・組織化学解析

マウス肝臓を 4%パラホルムアルデヒドで固定した後、凍結切片を作製した。一部は、ヘマトキシリン・エオジン(HE)染色を行った。また、COX-2 あるいは mPGES-1 とマクロファージマーカーの F4/80 抗体を用いて免疫組織染色を行った。

(6) 肝機能検査

疾病モデル動物にジオスゲニンを投与後、血液を採取し、POP・TOOS 法により ALT と AST 活性を測定した。

4. 研究成果³⁾

(1) ジオスゲニンによる COX-2 と mPGES-1 の発現抑制と GR アンタゴニストによる COX-2 発現の回復

A549 細胞にジオスゲニンを添加したところ、濃度依存的に COX-2 と mPGES-1 の発現を抑制することが示された (図 1A)。グルココルチコイド受容体 (GR) 拮抗薬の RU486 を用いて検討したところ、GR 作動薬のデキサメタゾン (Dex ; 100 nM) による *PTGS2* (COX-2) 発現の抑制を、RU486 添加により回復することを確認した (図 1B)。次に、ジオスゲニンによる *PTGS2* 発現抑制も、RU486 濃度依存的に回復することが示され、ジオスゲニンが GR を介して *PTGS2* の発現を抑制することが示された (図 1B)。さらに、COX-2 の強力な転写因子である nuclear factor-kappa B (NF-κB) の免疫染色の結果 (図 1C)、COX-2 が恒常的に高発現する A549 細胞では、通常核内に存在する NF-κB が、ジオスゲニン添加により細胞質へ移行し、RU486 添加で再び核に移行していることを確認した。本研究では、食品由来成分のジオスゲニンが GC と同様の作用を有し、NF-κB の作用を制御することで、COX-2 の発現を抑制することが示された。以上の結果より、ジオスゲニンの COX-2 発現抑制の作用機序が明らかとなった。

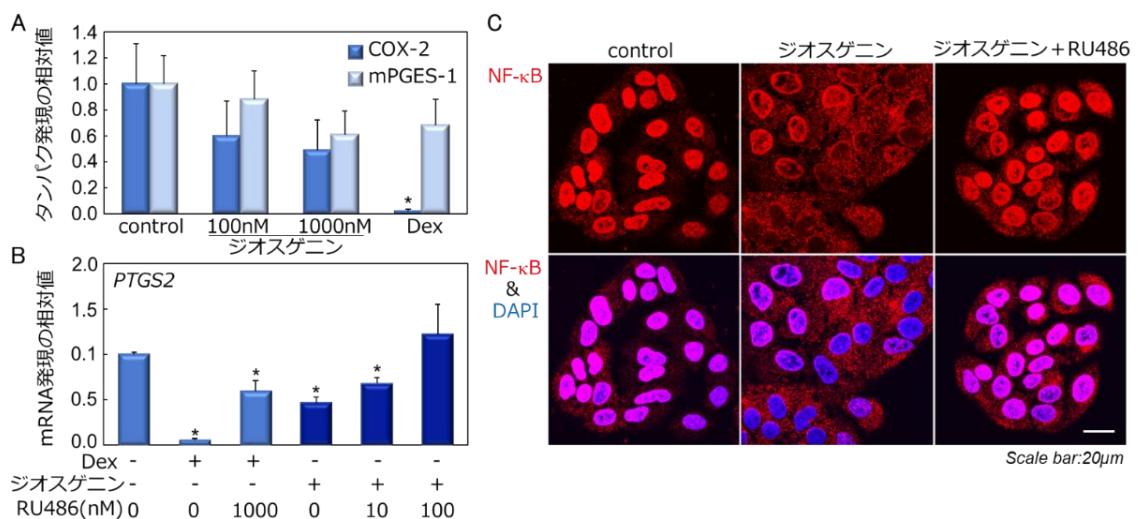


図 1. A549 細胞におけるグルココルチコイド受容体を介したジオスゲニンの効果
* $p < 0.01$ vs ジオスゲニン(-) / Dex(-) / RU486(-)

(2) 疾病モデルマウスにおけるジオスゲニンの効果

ジオスゲニンの効果を、LPS 誘発急性肝障害モデルマウスを用いて検証した。LPS 投与 6 時間後の肝臓において有意に上昇した *Ptgs2* (COX-2) と *Ptges* (mPGES-1) の発現上昇が、ジ

オスゲニン投与により、有意に抑制されることが示された (図 2A)。

また、HE 染色の結果、LPS(+)マウス肝臓では、正常な肝臓と比較して、肝小葉構造の乱れと肝類洞の間隙の拡張がみられ、炎症性細胞の浸潤上昇が観察された (図 2B)。

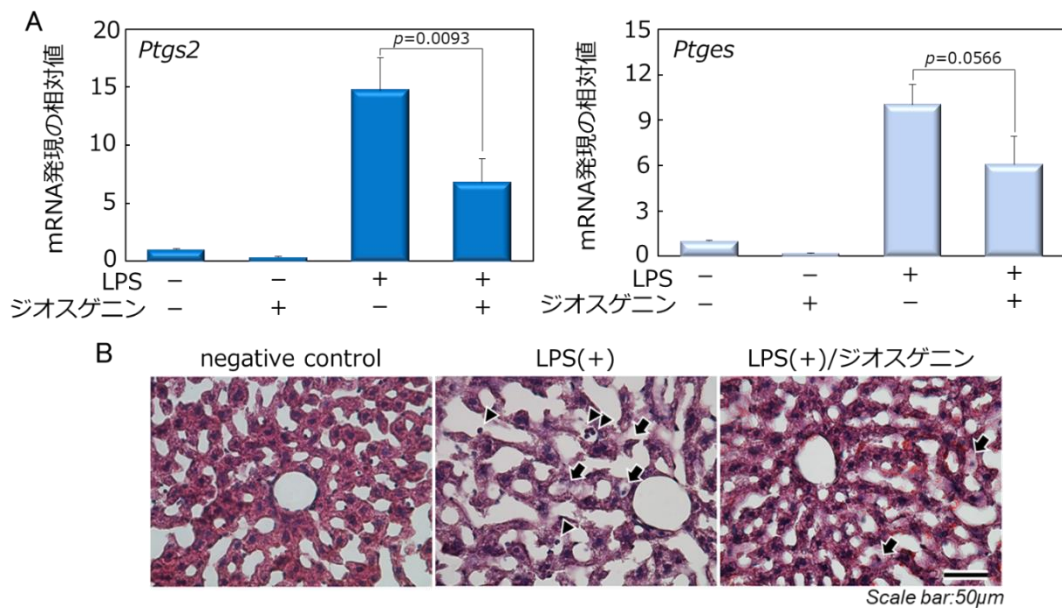


図 2. LPS 誘発肝障害モデルマウスにおける *Ptgs2* と *Ptges* の発現動態と病理組織解析
矢印：マクロファージ (MΦ)、矢尻：好中球

さらに、ジオスゲニン投与により、組織構造の修復と炎症性細胞の浸潤低下が認められた。次に、COX-2 と mPGES-1 の特異的抗体を用いて免疫組織化学解析を行った。COX-2 とマクロファージマーカーF4/80 との蛍光免疫二重染色の結果から、LPS(+) 処理により COX-2 陽性細胞数が増加し、F4/80 陽性マクロファージと肝類洞内皮細胞に発現していた (図 3A 上段)。また、ジオスゲニン投与により、特にマクロファージでの COX-2 の発現が低下していた。その陽性細胞数を計測した結果、F4/80 陽性細胞数は、ジオスゲニン投与によって変化しないが、COX-2 陽性細胞数は、negative control と同程度に減少し、特に F4/80 陽性細胞での COX-2 発現が約 30%減少していることが分かった (図 3B)。また、mPGES-1 も同様に、LPS 処理で陽性細胞数が増加し、F4/80 陽性マクロファージと肝類洞内皮細胞での発現が認められた (図 3A 下段)。さらに、ジオスゲニン投与で、特にマクロファージでの発現が著しく低下した (図 3B)。

慢性炎症性疾患である非アルコール性脂肪性肝炎 (NASH) 様モデルマウスを用いた検討でも、ジオスゲニン投与による病態の改善と、細胞選択的な COX-2 発現抑制効果を確認した。

また肝機能検査を行い、ジオスゲニンの 8 週間連続投与による臓器機能障害を評価したところ、正常時と比べ ALT と AST 値の有意な変化は見られなかったことから、長期投与時の安全性が示唆された。

以上の結果から、ジオスゲニンは、肝臓マクロファージ選択的に COX-2 と mPGES-1 の発現を抑制し、急性あるいは慢性の肝炎を改善することが示された。既存薬の NSAIDs は、全ての細胞に発現する COX 活性を阻害するため、血管内皮細胞で産生される PGI₂ の産生を減少させ、血栓のリスクを上昇させるが、ジオスゲニンは、マクロファージ選択的に作用し、

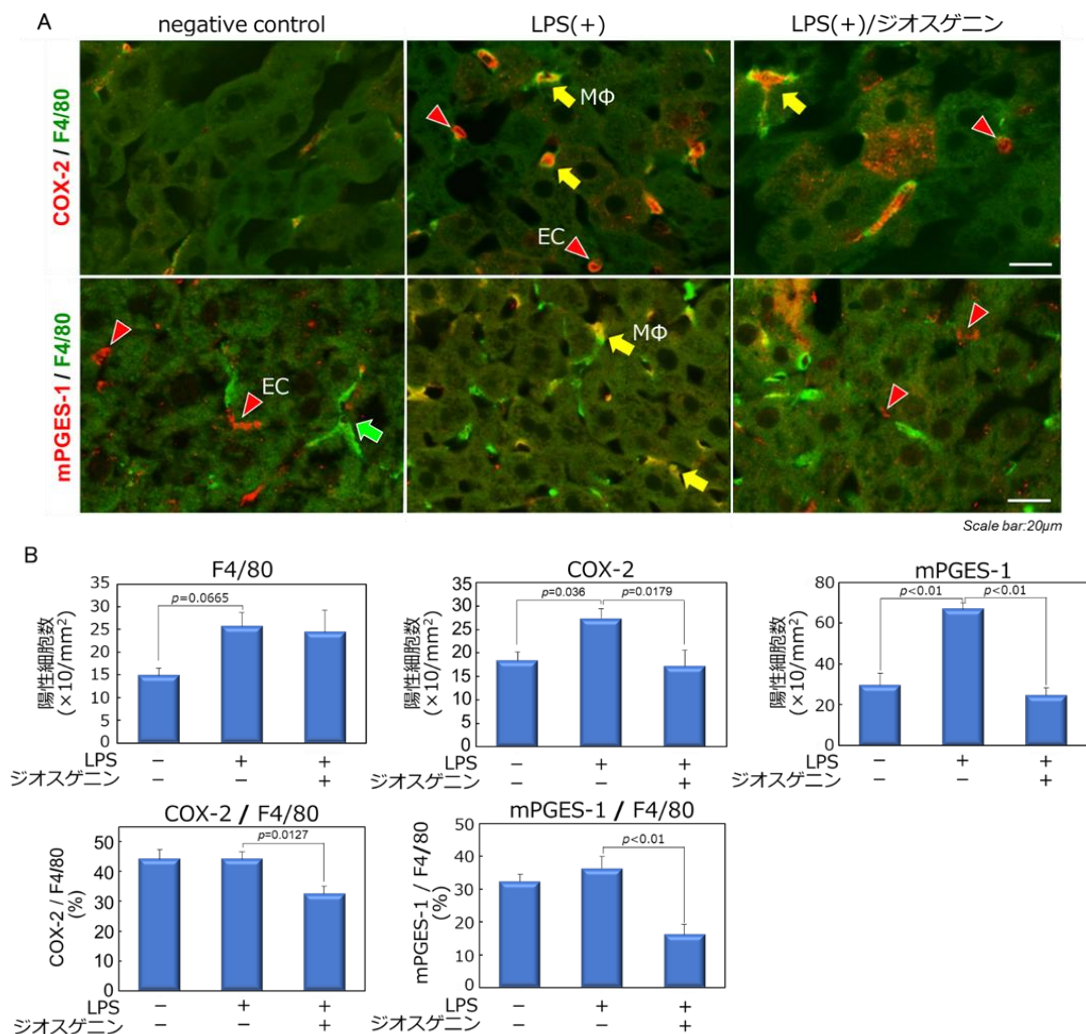


図 3. LPS 誘発肝障害モデルマウス肝臓の免疫組織化学解析
 矢印：マクロファージ (MΦ)、矢尻：肝類洞内皮細胞

血管内皮細胞の PGI₂ を維持する。よって、ジオスゲニンは、NSAIDs で生じる副作用を軽減すると考えられる。

<引用文献>

- (1) T. Suzuki-Yamamoto, S. Tanaka, I. Tsukayama, M. Takafuji, T. Hanada, T. Arakawa, Y. Kawakami, M. Kimoto, Y. Takahashi, *Dioscorea japonica* extract down-regulates prostaglandin E₂ synthetic pathway and induces apoptosis in lung cancer cells, *J. Clin. Biochem. Nutr.* 55 (2014) 162-167.
- (2) I. Tsukayama, K. Toda, Y. Takeda, T. Mega, M. Tanaka, Y. Kawakami, Y. Takahashi, M. Kimoto, K. Yamamoto, Y. Miki, M. Murakami, T. Suzuki-Yamamoto, Preventive effect of *Dioscorea japonica* on squamous cell carcinoma of mouse skin involving down-regulation of prostaglandin E₂ synthetic pathway, *J. Clin. Biochem. Nutr.* 62 (2018) 139-147.
- (3) I. Tsukayama, T. Mega, N. Hojo, K. Toda, Y. Kawakami, Y. Takahashi, T. Suzuki-Yamamoto, Diosgenin suppresses COX-2 and mPGES-1 via GR and improves LPS-induced liver injury in mouse, *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 156 (2021) 106580.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 4件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Izumi Tsukayama, Takuto Mega, Nana Hojo, Keisuke Toda, Yuki Kawakami, Yoshitaka Takahashi, Toshiko Suzuki-Yamamoto.	4. 巻 156
2. 論文標題 Diosgenin suppresses COX-2 and mPGES-1 via GR and improves LPS-induced liver injury in mouse.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Prostaglandins and Other Lipid Mediators.	6. 最初と最後の頁 106580
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.prostaglandins.2021.106580	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計11件（うち招待講演 0件／うち国際学会 3件）

1. 発表者名 津嘉山泉, 福野沙也加, 戸田圭祐, 川上祐生, 高橋吉孝, 山本登志子
2. 発表標題 ジオスゲニンのプロスタグランジンE2合成系酵素の発現抑制と慢性肝炎に対する改善効果
3. 学会等名 第74回日本栄養・食糧学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 1. 津嘉山泉, 目賀拓斗, 北條奈々, 戸田圭祐, 川上祐生, 高橋吉孝, 山本登志子
2. 発表標題 植物ステロールジオスゲニンによるグルココルチコイド受容体を介したプロスタグランジンE2合成系酵素の発現抑制とLPS誘発肝障害モデルマウスにおける効果
3. 学会等名 第94回日本生化学会大会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------