

機関番号：23401

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20580139

研究課題名 (和文) 抗炎症性食因子と作用機構に基づくそれら因子の化学的類型化

研究課題名 (英文) Exploration of anti-inflammatory food factors from plant diets, and chemical classification of such factors based on their action mechanisms

研究代表者

大東 肇 (OHIGASHI HAJIME)

公立大学法人福井県立大学・生物資源学部・特任教授

研究者番号：80026583

研究成果の概要 (和文)：抗炎症性と密接に関連する細胞レベルの実験系である NO 産生抑制および O₂⁻ 産生抑制試験系を用いて植物性食素材 (福井県特産農作物を中心に約 20 種) のスクリーニング試験を実施した。その結果、ナツメをはじめとする 11 種を注目すべき種として選択できた。次いで、これら高活性の素材より順次有効成分の精製・単離を試み、これまで 9 種の化合物を同定することに成功した。

一方、近年、食素材由来の NO 産生抑制成分に関する研究展開は活発である。なかでも、普遍的抗酸化性食素材成分として知られるフラボノイドへの関心は高い。本研究では、そこで、酸化ストレスをも含む各種ストレスへの応答機構の一つである MAPK 情報伝達経路に着目し、抗炎症性フラボノイド関連化合物の本経路に与える影響について解析し、フラバノール型、フラボン・フラバノン・フラバノン型、およびイソフラボン・カルコン型化合物群にはそれぞれ異なった作用ポイントがあることを見いだした。現在、クマリン型やテルペノイド型化合物を含め、より詳細な活性発現機構を解析中である。

研究成果の概要 (英文)：Using cellular level-bioassays, vegetables and fruits which carry NO or O₂⁻ generation inhibitory properties have been explored. Of the 20 species tested, 11 were found to have significant NO or O₂⁻ generation inhibitory activities. From the active plants, 9 active principles have thus far been identified.

Recently, information on the NO generation inhibitors from dietary plants has been largely accumulated. In particular, flavonoids have been of special interests. In our study, . action mechanisms of anti-inflammatory flavonoids have been analyzed. We focused particularly on the mechanisms toward iNOS and COX-2 induction through the activation of MAPKs, which are generally known to be one of the major signaling pathways responsible for several stresses. Our results suggested that action points for expression of iNOS and COX-2 proteins through MAPK signaling pathway were different among flavanol- and chalcone-types, flavone-, flavanone-, and flavanol-types and isoflavone-types of compounds. Further mechanistic studies are now on going for coumarin- and terpenoid-types of compounds.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：食品機能化学

科研費の分科・細目：農芸化学・食品科学

キーワード：食品、生理活性、農林水産物、バイオテクノロジー、シグナル伝達

1. 研究開始当初の背景

近年、クローン病や潰瘍性大腸炎などのいわゆる炎症性腸疾患、さらには大腸がんなどが激増している。これら疾患の原因や成立機構は未だ完全には解明されていないが、多くの場合マクロファージや好中球などの炎症細胞由来のフリーラジカル、サイトカイン、プロスタノイドなどの炎症関連因子間の複雑なクロストークが関与しており、その予防や進展阻止のための現実的アプローチとして抗炎症性食因子の究明やその応用が望まれていた。

2. 研究の目的

上記のような背景下、本研究では、炎症関連腸疾患の食事レベルでの有効な予防を目標に、次(1)~(3)を主要な目的としている。

(1) 炎症が関与する大腸関連疾患を予防・軽減する新たな食材やその化学因子の解明を行う。

(2) 炎症過程において特に重要とされる誘導性 NO 合成酵素 (iNOS) とシクロオキシゲナーゼ-2 (COX-2) の発現に対する作用機序を詳細に解析する

(3) 作用機序別に活性食因子種を整理・類型化する。

3. 研究の方法

抗炎症活性評価法：抗炎症活性は主として、次の2種(①および②)の試験法を用い評価する。①RAW264.7 (または RAW264) 細胞による NO 産生抑制試験：LPSおよびIFN- γ で刺激したRAW264.7 (RAW264) 細胞から生じるNOを定量し、この産生を抑制する食素材や食因子を探索・追跡する。

②分化 HL-60 による O_2^- 産生抑制試験：HL-60 を DMSO で好中球様細胞に分化させた後TPA で刺激すると、NADPH オキシダーゼの活性化を介して O_2^- が発生する。本系において O_2^- 産生阻害性食材や食因子の追跡を行う。

抗炎症性植物食素材の探索と活性食因子の化学的解明：福井県特産農作物をはじめ多彩な植物性食素材を対象に上記試験法にてスクリーニング試験を実施し、有用な種より有効成分の化学的解明を行う。

MAPK 経路における iNOS および COX-2 発現抑制機序の解析と抗炎症性食因子の化学的類型化：炎症刺激に応答する代表的な情報伝達系として MAPキナーゼ (MAPK) 経路に着目し、RAW 細胞における iNOS や COX-2 の発現度合いをタンパク質や mRNA レベルで解析するとともに、それらの発現に繋がる本経路中の重要因子 (JNK、ERK、NF κ B など) の活性化状態をそれぞれの特異的抗体を利用し、

定量・検定する。その第一歩として、機能性食品因子としてフラボノイドを対象に実験技術の確立を目指し、技術が確立した段階で同様の解析を非フラボノイド系ポリフェノール、フェニルプロパノイドならびにテルペノイドへと順次対象を拡げてゆく予定である。

4. 研究成果

(1) *in vitro* 試験系にて、福井県特産食用植物と位置付けられるナツメ、赤ズイキ (サトイモの地上部)、ラッキョウなどに強い NO 産生抑制活性が、また、キダチリメンシソやサトイモには O_2^- 産生抑制活性が認められた。さらに、アボカドやハウレンソウなどにも強力な NO 産生抑制活性が確認できた。

(2) 有用な植物より順次有効成分の精製・単離・構造決定を試みた。ここまで、図1に示す9種(1~9)の化合物が同定できている。なお、化合物1~8はNO産生抑制成分、9は O_2^- 産生抑制成分として単離されたものである。なお、化合物2は1より化学的に誘導したものである。

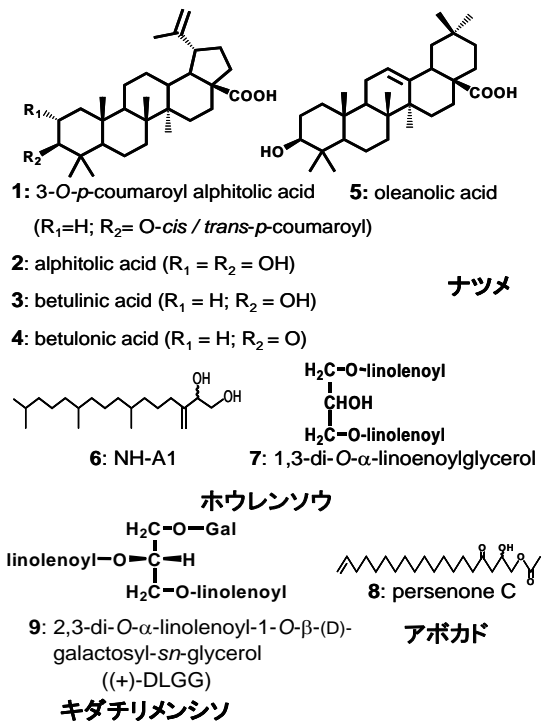


図1. NO または O_2^- 産生抑制性食因子

(3) 普遍的食素材成分として注目されているフラボノイド関連成分を、フラボン、フラバノール、フラバン、フラバノン、イソフラボン、カルコン型の6群に分類(総計22種)し、それぞれのNO産生抑制活性を求めた。次いで、各群より代表的なNO産生抑制物質

を選択し、iNOS および COX-2 タンパク質 および mRNA の発現度合いや、MAPKs の活性化に与える影響などを調べた。その結果、カテキン類を含むフラバノール型 (エピガロカテキン-3-ガレート: EGCG) 化合物や C 環の開環したチャルコン(CHA)では LPS による MAPKs (ERK, JNK, p38) の活性化を抑制し、フラボン (アピゲニン: API)、フラバノン (ナリンゲニン: NAR)、フラボノール型 (ケンフェロール: KAE) 化合物では MAPKs の活性化段階には影響を及ぼさず、iNOS や COX-2 mRNA の転写段階に作用することが示唆された。さらにまた、イソフラボン型 (ゲニステイン: GEN) は、転写段階での作用とともに、iNOS および COX-2 の翻訳段階でも何らかの作用があることが明らかとなった。(図 2 参照)

今後、フラボノイドばかりでなく、クマリン系やテルペノイド系成分についても MAPKs 経路に与える影響を解析し、抗炎症性食素材成分についての総合的・系統的類型化を踏る予定である。

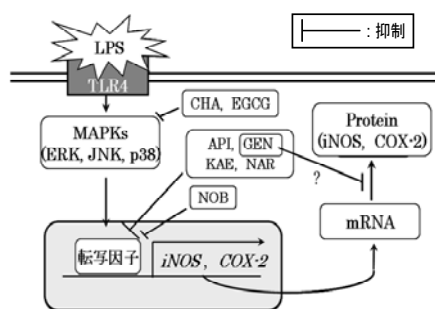


図2. フラボノイド関連成分の MAPK 経路における作用点
NOB: nobiletin は柑橘由来のフラボン型ポリメチキフラボノイドで、転写段階に作用する既知ポジティブコントロールとして用いた

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 16 件、うち総説 5 件を含む)

- ①大東 肇: 食による生活習慣病の予防—学術界のこれからの責務, 日本予防医学会誌, 査読有, 6, 2011, 3-6
- ②高橋正和, 大東 肇: 福井県産農作物のラジカル産生抑制活性の比較検討, 査読有, 福井県立大学論集, 35, 2010, 1-5
- ③Kim, M., Ohigashi, H. ら (5 名中 5 番目): The modifying effects of green tea polyphenols on acute colitis and inflammation-associated colon carcinogenesis in male ICR mice, BioFactors, 査読有, 2010, 43-51
- ④Miyamoto, S., Ohigashi, H. ら (5 名中 3 番目): Dietary flavonoids suppress azoxymethane-induced colonic preneoplastic lesions in male

- C57BL/KsJ-db/db mice, Chemico-Biological Interactions, 査読有, 130, 2010, 276-283
- ⑤Yasuda, M., Ohigashi, H. ら (7 名中 3 番目): Linoleic acid metabolite suppresses skin inflammation and tumor promotion in mice: possible roles of programmed cell death 4 induction, Carcinogenesis, 査読有, 2009, 1209-1216
- ⑥Lee, J.K., Ohigashi, H. ら (4 名中 4 番目): Suppressive properties of extracts from Japanese edible plants regarding nitric oxide generation, Asian Pacific J. Cancer Prev., 査読有, 10, 2009, 261-270
- ⑦Kuki, W., Ohigashi, H. ら (4 名中 4 番目): Metabolism and absorption of auraptene (7-geranoyloxycoumarin) in male SD rats: comparison with 7-ethoxycoumarin, Nutr. Cancer, 査読有, 60, 2008, 368-372
- ⑧Miyamoto, S., Ohigashi, H. ら (5 名中 4 番目): Suppressive effects of nobiletin on hyperleptinemia and colitis-related carcinogenesis in male ICR mice, Carcinogenesis, 査読有, 29, 2008, 1057-1063

[学会発表] (計 19 件)

- ①杉山友太, 高橋正和, 大東 肇 ら 5 名: ナツメに含まれる NO 産生抑制成分の単離・同定と作用機序解析, 日本農芸化学会 2011 年度大会, 2011 年 3 月 27 日, 京都
- ②中村志織, 高橋正和, 大東 肇 ら 5 名: ホウレンソウに含まれる NO 産生抑制物質, 日本農芸化学会 2011 年度大会, 2011 年 3 月 27 日, 京都
- ③中村志織, 高橋正和, 大東 肇: ホウレンソウに含まれる NO 産生化合物の単離・構造決定, 北陸合同バイオシンポジウム, 2010 年 11 月 12 日, 福井
- ④杉山友太, 高橋正和, 大東 肇 ら 4 名: ナツメから単離した NO 産生抑制物質の構造および作用機構解析, 北陸合同バイオシンポジウム, 2010 年 11 月 12 日, 福井
- ⑤川畑球一, 高橋正和, 大東 肇 ら 4 名: 抗炎症性フラボノイドの作用機構に関する構造活性相関研究, 北陸合同バイオシンポジウム, 2010 年 11 月 12 日, 福井
- ⑥杉山友太, 高橋正和, 大東 肇 ら 4 名: ナツメに含まれる NO 産生抑制物質の単離・構造決定・特性解析, 第 15 回日本フードファクター学会, 2010 年 10 月 4 日, 仙台
- ⑦村上 明, 大東 肇 ら 5 名: Leptin 産生と大腸発がんに対するフラボノイドの抑制効果, 第 10 回 AOB 研究会, 2010 年 6 月 4 日, 神戸
- ⑧高橋 有, 高橋正和, 大東 肇: 抗炎症作用をもつ福井県産農作物の探索—木田チリメンシソの活性成分, 富山・福井・石川県立大

学合同シンポジウム, 2009年12月18日, あ
わら市 (福井県)

⑨古川育代, 大東 肇ら 5名: ターメリック
成分tumeronesとcurcuminの Maus大腸発がん
抑制作用, 第16回日本がん予防学会,
2009年6月16日, 名古屋

⑩Ohigashi, H., Murakami, A.: Towards the
chemoprevention with foods:
phytochemicals, animal model studies and
possible action mechanisms,
Italian-Japanese Joint Symposium on
Natural Products and Functional Foods,
2008年6月27日, Salerno (Italy)

[図書] (計6件)

①大東 肇: 日本医事新報社, 「癌患者の臨床
栄養」第2章 “癌の発生と栄養”(分担執
筆), 2010, 43-45

②大東 肇: 建帛社, 「栄養とがん」 “食に
よるがん予防”, 2009, 31-54

③ Murakami, A., Ohigashi, H. :
Wiley-Blackwell, 「Nutrigenomics and
Proteomics in Health and Disease」
“Anti-inflammatory and Anti-
carcinogenesis Potentials of Citrus
Coumarins and Polymethylated Flavonoids”,
2009, 311-324

④大東 肇: 京都大学出版会, 「食品の創造」
“食による生活習慣病の予防”, 2008,
175-196

⑤大東 肇: (株)産業技術サービスセンター,
「食品機能性の科学」 (分担執筆), 2008,
46-47 および 54-55

[産業財産権]

○出願状況 (計2件)

①名称: 組成物および同組成物を含有する飲
食物

発明者: 大東 肇ら 6名

権利者: ヤエガキ発酵技研 (株)

種類: 特許

番号: 2009-118336

出願年月日: 2009年5月15日

国内外の別: 国内

②名称: 抗酸化剤

発明者: 大東 肇ら 3名

権利者: (株)琉球バイオリソース開発

種類: 特許

番号: 2008-132743

出願年月日: 2009年5月21日

国内外の別: 国内

○取得状況 (計0件)

該当なし

[その他]

ホームページ等

<http://www.s.fpu.ac.jp/food/>

http://fpuinfo.fpu.ac.jp/fpu/system/php/faculties_open/showone.php?id=ohigashi

6. 研究組織

(1) 研究代表者:

大東 肇 (OHIGASHI HAJIME)

福井県立大学・生物資源学部・特任教授

研究者番号: 80026583

(2) 研究分担者

高橋正和 (TAKAHASHI MASAKAZU)

福井県立大学・生物資源学部・講師

研究者番号: 80315837