

令和 6 年 6 月 16 日現在

機関番号：21102

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20K02402

研究課題名（和文）新規植物由来エストロゲンの探索と更年期症状軽減効果の評価

研究課題名（英文）Search for novel plant-derived estrogens and evaluation of their effect on alleviation menopausal symptoms

研究代表者

七島 直樹（Nanashima, Naoki）

青森県立保健大学・健康科学部・教授

研究者番号：80333730

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,800,000円

研究成果の概要（和文）：フィトエストロゲンは植物に含有されているエストロゲン様活性を示す物質の総称である。本研究の目的は、新規の植物由来エストロゲンの定量および分子構造の解析、そしてこの分子のフィトエストロゲン活性の評価である。研究の結果、カシスには微量の17 $\beta$ -エストラジオールを含む哺乳類性エストロゲンが含有されていることが明らかになった。一方で、エストロゲンの他に化合物Aを検出・単離した。種々のアッセイを行ったところ化合物Aは、フィトエストロゲン活性を有することが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究によって、カシスには哺乳類性エストロゲンが含有されていることが明らかになった。また、化合物Aという新規のフィトエストロゲンが含有されることを明らかにした。閉経後の女性はエストロゲンの分泌量が減少するために脂質代謝異常や心血管系疾患のリスクが高くなり、エストロゲン補充療法ではこれらの疾患は改善できるものの、逆に乳がんや子宮内膜がんの発生の危険性を増加させることが知られている。フィトエストロゲンは一般的に活性が弱いことが知られており、本研究で見出されたカシス由来エストロゲンを応用して、更年期障害症状を軽減するような新たなサプリメントや治療薬としての開発に繋がることを期待された。

研究成果の概要（英文）：Phytoestrogens is a general term for substances present in plants that exhibit estrogen-like activities. The purpose of this study was to quantify new plant-derived estrogens, analyze their molecular structures, and evaluate their phytoestrogenic activities. This study revealed that blackcurrant fruit contains trace amounts of 17 $\beta$ -estradiol. In addition to estrogens, compound A was detected and isolated. Various assays showed that compound A exhibits phytoestrogenic activity.

研究分野：食品機能学

キーワード：カシス エストロゲン

## 様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

植物にはエストロゲン様作用を有する分子が含まれており、これらはフィトエストロゲン(植物性エストロゲン)と総称される。更年期になると特に女性の場合、女性ホルモンであるエストロゲンが急激に減少し、脂質代謝異常や骨粗鬆症などの更年期症状を引き起こす事が知られている。更年期症状を軽減するため、食生活においては、イソフラボン等のフィトエストロゲンを含有する大豆製品の摂取が有効であると広く知られている。

ザクロの種子等いくつかの植物にはフィトエストロゲンではなく、微量な動物性エストロゲン(植物由来エストロゲン)が含まれることが数件報告されている。しかしながら、これまでの報告における植物由来エストロゲンの検出は薄層クロマトグラフィーなどの簡便・古典的な手法によるものであり、植物由来エストロゲンの種類や含有量は未知である。

申請者らは最近になって、メタボローム解析によって、カシスにエストロン、17 $\beta$ -エストラジオール、17 $\alpha$ -エストラジオール等の植物由来エストロゲンが含まれている事を見出し、さらに、このカシスのエストロゲン様活性は従来の動物性エストロゲンほどは強くない事を明らかにしている。これらの結果から植物由来エストロゲンの構造は既知の動物性エストロゲンの分子構造とは異なることが考えられる。

### 2. 研究の目的

前述の背景より、本研究では以下の2点を研究期間に明らかにすることを目的とした。

カシス・大豆等のフィトエストロゲン効果の高い青果物を対象に新規の植物由来エストロゲンの単離および定量、分子構造の決定。

同定された植物由来エストロゲンの活性を評価する。

### 3. 研究の方法

#### 【植物由来エストロゲンの抽出・定量・構造決定】

本研究では下記の手法で植物由来エストロゲンの抽出および定性・定量を行った。

1. カシス果皮エタノール抽出物の乾燥粉末中のエストロゲンを液体クロマトグラフィー質量分析法によって定量した。

2. カシスをホモジナイズし、95%エタノールで抽出した。遠心分離・濾過後、分液漏斗に移してクロロホルムを加えて、クロロホルム層を分取する作業を繰り返し、エバポレータでクロロホルム層を濃縮・乾固した後、95%エタノールに溶解し、逆相クロマトカラムを用いた高速液体クロマトグラフィー(HPLC)にて分析した画分を280nmで測定した。

3. HPLCによりエストロゲンにピークが近い物質を分取後液体クロマトグラフィー質量分析し、280nmの主要成分の構造を推定した。280nmの主要成分は精密質量から組成式を算出した。算出した組成式を基にデータベースを検索した。

#### 【植物由来エストロゲンの活性評価】

1. MCF7細胞にピークXを投与し、5日間培養後、細胞数を計測した。MCF7細胞はエストロゲン受容体強発現でエストロゲンに依存して増殖する細胞であり、一般的にエストロゲン活性の評価に使用されている。

2. エストロゲン受容体の下流遺伝子(カテプシンDやプロゲステロン受容体など)の発現変動をリアルタイムPCRで評価した。

3. 化合物Aがエストロゲン受容体およびエストロゲンに結合して核内DNAの遺伝子調節部位に結合し、機能するのかをレポーターアッセイにより評価した。

4. 化合物Aがエストロゲン受容体およびエストロゲンに対してどの程度の結合能力があるのかを競合アッセイ法で評価した。

5. エストロゲンの投与によってアルカリホスファターゼ(ALP)の発現が誘導される子宮内膜がん由来のIshikawa細胞に化合物A画分を投与してアルカリホスファターゼの活性を測定した。加えて、上記の効果がエストロゲン受容体阻害剤存在下で阻害されるのかを評価した。

6. ヒトエストロゲン受容体を発現しているヒト乳がん細胞・T47D-KBlucによるレポーターアッセイ(エストロゲン応答配列をもつレポーター遺伝子導入細胞を用いたルシフェラーゼ発現誘導)を行った。

7. 結合様式をコンピューター上でシミュレートし、エストロゲン受容体と化合物Aとの相互作用を可視化する*in silico*解析を行った。

### 4. 研究成果

#### 【植物由来エストロゲンの抽出・定量・構造決定】

液体クロマトグラフィー質量分析法によってカシス果実と果皮のエタノールで抽出液を粉末化したカシス粉末を試料として動物性エストロゲンを定量したところ、果実では0.55pg/gのエストロンおよび0.25pg/gの17 $\beta$ -エストラジオールが検出された。また、粉末では試料が濃縮されているために、果実より約100倍高濃度の40.2pg/gのエストロンと24.5pg/gの17 $\beta$ -エ

トラジオールが検出された (表 1)

表 1. エストロゲンの定量

	エストロン	17 -エストラジオール
カシス果実 (pg/g)	0.55 ± 0.2	0.25 ± 0.1
カシス粉末 (pg/g)	40.2 ± 5.1	24.5 ± 2.0

HPLC でカシス粉末を分析した。17 -エストラジオールを標準物質として使用した際、保持時間約 15 分のところにピークが見られた。一方、カシス粉末は保持時間約 18 分のところにピーク (ピーク X と命名) が見られた (図 1)。このピーク X を分取後、液体クロマトグラフィー質量分析法で解析した結果、このピーク X は当初予想していた何らかの分子が修飾された動物性エストロゲンではなく化合物 A (仮称) であることが明らかになった。

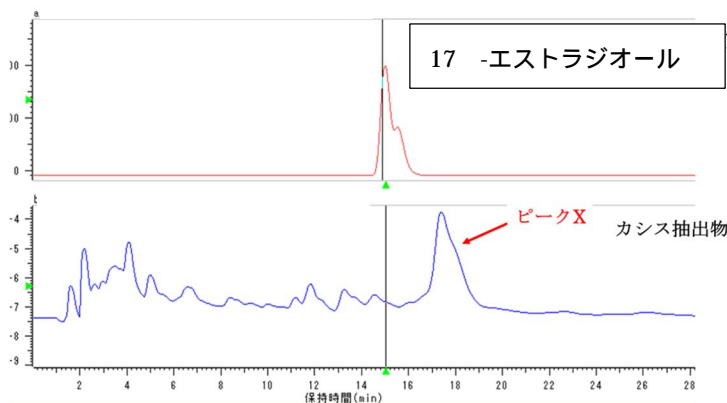


図 1. HPLC における 280nm のクロマトグラム

【植物由来エストロゲンの活性評価】

MCF7 細胞 (エストロゲン受容体陽性) にピーク X を加え細胞増殖アッセイを行うと、1 µg/ml と 10 µg/ml の濃度で細胞増殖が認められたが、エストロゲン受容体阻害剤を添加するとこの増殖は抑制された。また、エストロゲン受容体が発現していない MDA-MB-231 細胞を用いて同様の実験をしても、細胞増殖は認められなかった。したがって、ピーク X はエストロゲン受容体を介して MCF7 の細胞増殖を促進させていたことが示唆された。MCF7 細胞をピーク X で処理し、エストロゲン受容体の下流遺伝子 (pS2, Cathepsin D, PGR) の発現をリアルタイム PCR で解析したところ、いずれの遺伝子もピーク X の濃度依存的に発現量が増加していた (図 2)。

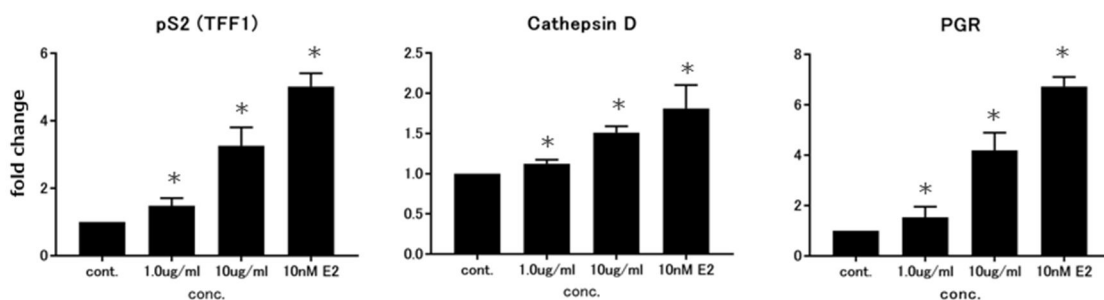


図 2. エストロゲン受容体下流遺伝子の発現変化 (\*: p<0.05)

ISHIKAWA 細胞を同様にピーク X で処理すると、アルカリホスファターゼの活性が亢進した。また、T47D-KBluc 細胞をピーク X で処理し、レポーターアッセイ法によって評価すると、濃度依存的に活性が上昇した。エストロゲン受容体 との結合アッセイでは、ピーク X はエストロゲン受容体 と結合する結果が得られた。化合物 A について、ヒトエストロゲン受容体 (ER) 及び ER のリガンド結合ドメインとの結合の可能性を調べるため、ドッキング解析 (*In silico*) を行った。17 -エストラジオールを結合した ER の立体構造に対して化合物 A のドッキングを試みたところ、17 -エストラジオールを結合した ER および ER のコンフォメーションでは、ER のリガンド結合ポケットには化合物 A の立体構造が収容可能な空間がなく、化合物 A が結合するのは難しいと考えられた。したがって、E2 よりもかさの高い複合体の立体構造を使用してドッキング解析を試みるなどの改善策が必要であることが示唆された。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 6件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Shimada Minori, Maeda Hayato, Nanashima Naoki, Yamada Kiyofumi, Nakajima Akira	4. 巻 46
2. 論文標題 Anthocyanin rich blackcurrant extract improves long term memory impairment and emotional abnormality in senescence accelerated mice	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Food Biochemistry	6. 最初と最後の頁 e14295
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/jfbc.14295	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Horie Kayo, Nanashima Naoki, Yokoyama Yoshihito, Yoshioka Haruhiko, Watanabe Jun	4. 巻 27
2. 論文標題 Exosomal MicroRNA as Biomarkers for Diagnosing or Monitoring the Progression of Ovarian Clear Cell Carcinoma: A Pilot Study	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Molecules	6. 最初と最後の頁 3953 ~ 3953
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/molecules27123953	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 -
1. 著者名 Kayo Horie, Hayato Maeda, Naoki Nanashima, Indrawati Oey	4. 巻 26
2. 論文標題 Potential Vasculoprotective Effects of Blackcurrant ( Ribes nigrum) Extract in Diabetic KK-A y Mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Molecules	6. 最初と最後の頁 6459
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/molecules26216459.	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 該当する
1. 著者名 Naoki Nanashima, Kayo Horie, Maiko Kitajima, Shizuka Takamagi, Kasumi Mikami, Naoya In, Toshiko Tomisawa	4. 巻 26
2. 論文標題 Hypocholesterolemic Effect of Blackcurrant ( Ribes nigrum) Extract in Healthy Female Subjects: A Pilot Study	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Molecules	6. 最初と最後の頁 4085
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/molecules26134085.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Maiko Kitajima, Marika Miura, Naoki Nanashima, Toshiko Tomisawa, Shizuka Takamagi, Miyuki Fujioka, Naoya In, Tomohiro Osanai	4. 巻 26
2. 論文標題 Psychological and Antibacterial Effects of Footbath Using the <i>Lindera umbellata</i> Essential Oil	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Molecules	6. 最初と最後の頁 5128
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/molecules26175128.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Naoki Nanashima, Kayo Horie, Kanako Yamanouchi, Toshiko Tomisawa, Maiko Kitajima, Indrawati Oey, Hayato Maeda	4. 巻 12
2. 論文標題 Blackcurrant ( <i>Ribes nigrum</i> ) Extract Prevents Dyslipidemia and Hepatic Steatosis in Ovariectomized Rats	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nutrients	6. 最初と最後の頁 1541
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/nu12051541	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 該当する

1. 著者名 Nanashima N, Kitajima M, Takamagi S, Fujioka M, Tomisawa T.	4. 巻 23
2. 論文標題 Comparison of Chemical Composition between Kuromoji ( <i>Lindera umbellata</i> ) Essential Oil and Hydrosol and Determination of the Deodorizing Effect.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Molecules	6. 最初と最後の頁 4195
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/molecules25184195.	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 -

1. 著者名 Horie K, Nanashima N, Maeda H, Tomisawa T, Oey I.	4. 巻 13
2. 論文標題 Blackcurrant ( <i>Ribes nigrum</i> L.) Extract Exerts Potential Vasculoprotective Effects in Ovariectomized Rats, Including Prevention of Elastin Degradation and Pathological Vascular Remodeling.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nutrients	6. 最初と最後の頁 560
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/nu13020560	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 該当する

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 七島直樹、堀江香代、前多隼人
2. 発表標題 Alleviating effects of blackcurrant extract against dyslipidemia in menopausal and diabetic animal models
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会 日本生物物理学会 共催
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 七島直樹、堀江香代、前多隼人、Indrawati Oey
2. 発表標題 カシス抽出物は更年期モデルラットにおける脂質異常症を軽減する
3. 学会等名 2022年度青森県保健医療福祉研究発表会・日本ヒューマンケア科学学会第15回学術集会 合同集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Naoki Nanashima, Kayo Horie, Indrawati Oey, Hayato Maeda
2. 発表標題 更年期モデルラットにおけるカシス抽出物の脂質異常症に対する軽減効果
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 島田 美理 , 前多 隼人 , 七島 直樹 , 山田 清文 , 中島 晶
2. 発表標題 老化促進モデルマウスSAMP8の行動異常に対するアントシアニン高含有カシス抽出物の効果
3. 学会等名 第93回日本薬理学会年会
4. 発表年 2020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
研究 分担者	堀江 祐範  (Horie Masanori)  (30514591)	国立研究開発法人産業技術総合研究所・生命工学領域・研究 グループ長   (82626)	
研究 分担者	堀江 香代  (Horie Kayo)  (30626825)	弘前大学・保健学研究科・准教授   (11101)	
研究 分担者	前多 隼人  (Maeda Hayato)  (80507731)	弘前大学・農学生命科学部・准教授   (11101)	

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
---------	---------