

令和 6 年 6 月 17 日現在

機関番号：35307

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20K11662

研究課題名（和文）黄ニラの細胞内グルタチオン上昇を介した肝臓保護作用に関する研究

研究課題名（英文）Hepatoprotective effects of yellow Chinese chives extract via elevation of intracellular glutathione

研究代表者

川上 賀代子（Kawakami, Kayoko）

就実大学・薬学部・講師

研究者番号：00505935

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：黄ニラは岡山県が生産量第1位の地方野菜のひとつである。岡山県産農産物の細胞内グルタチオン上昇作用を調べた結果、黄ニラに強い細胞内グルタチオン上昇作用があること、黄ニラが酸化ストレス応答系の転写因子であるNrf2を介して抗酸化タンパク質を誘導していることを明らかにした。さらに、その活性成分として(Z)-10-devinylajoeneを同定した。また、黄ニラ抽出物の摂取によりアセトアミノフェン誘導肝障害抑制作用が明らかとなった。以上の結果から、黄ニラ抽出物はNrf2経路を活性化することにより細胞内グルタチオン量を上昇させ、肝臓保護作用を示すことが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

酸化ストレスは、様々な疾病の発症や増悪化に関っており、生体内の抗酸化物質であるグルタチオン量を上昇させることは、酸化ストレスが関与する疾病の治療や予防に有効であることが期待される。本研究により黄ニラに細胞内グルタチオン上昇作用があること、活性成分が(Z)-10-devinylajoeneであることを明らかにした。本研究により、黄ニラが細胞内グルタチオン上昇を介して酸化ストレスによる肝臓障害保護作用を発揮することを明らかとなり、機能的食品への応用および地方野菜の振興につながると考えられる。

研究成果の概要（英文）： In this study, we showed that yellow Chinese chive extract (YCE) increased intracellular glutathione levels. Further, We identified (Z)-10-devinylajoene as a compound that increases intracellular glutathione levels from the yellow Chinese chives. Acetaminophen (APAP) is a commonly used analgesic. However, an overdose of APAP causes severe hepatotoxicity via depletion of the hepatic glutathione. Pretreatment with YCE significantly prevented increases in serum AST and ALT levels in mice. YCE led to an increased expression of Nrf2 and its target antioxidant enzymes. These results suggest that YCE could increase intracellular glutathione levels via activation of the Nrf2 antioxidant pathway, and protect against APAP-induced hepatotoxicity in mice.

研究分野：食品機能学

キーワード：黄ニラ グルタチオン 酸化ストレス 地方野菜

様式 C-19、F-19-1、Z-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

酸化ストレスは、様々な疾病の発症や増悪化に関っており、生体内の抗酸化物質であるグルタチオン量を上昇させることは、酸化ストレスが関与する疾病の治療や予防に有効であることが期待される。アセトアミノフェン (APAP) は解熱鎮痛剤と広く使用されているが、過剰に摂取すると肝臓中のグルタチオンが枯渇し、代謝物の NAPQI が酸化ストレスを引き起こすことで肝障害を誘導する。よって、肝臓中のグルタチオンを上昇させることにより、肝障害を軽減できると考えられる。

申請者のグループでは、ヒト肝臓ガン細胞 HepG2 において細胞内グルタチオン上昇作用を持つ食品成分のスクリーニングを行っており、岡山県産農産物の細胞内グルタチオン上昇作用を調べた結果、黄ニラに強い細胞内グルタチオン上昇作用があることを見出した。黄ニラは岡山県が生産量第 1 位であり、全国生産量の約 7 割を占めている岡山県の地方野菜のひとつである。黄ニラは、青ニラの地上部を刈り取り、被覆資材で太陽光を遮断する軟化栽培による周年出荷の野菜であり、先端と下端を切断して出荷される。前述の通り、黄ニラに細胞内グルタチオン上昇作用があることを確認しているが、その活性成分の同定には至っていない。また、黄ニラは細胞内グルタチオン上昇作用を示す成分が最も含まれている収穫時期や品種についても明らかとなっていない。

2. 研究の目的

本研究では、黄ニラが細胞内グルタチオン上昇作用を介して酸化ストレスを軽減し、APAP 誘導肝障害抑制作用および活性成分を明らかにすることにより機能性食品への応用を目的とした。

3. 研究の方法

(1) 黄ニラ抽出物の調製

黄ニラを細断後、50%エタノールを用いて抽出した。黄ニラは通常、太陽光を遮断して栽培・収穫されるが、太陽光に暴露（露光）することで葉の黄色が濃くなる。そこで、露光ありと露光なしの黄ニラについても調べた。

(2) 黄ニラ抽出物による細胞内グルタチオン上昇メカニズムの解明

ヒト肝がん細胞 HepG2 を 48 時間培養後、黄ニラ抽出物を添加し 1、3、8、24 時間後に細胞を回収した。タンパク質発現量はウエスタンブロッティングを用いて測定した。

(3) 活性成分の同定、構造解析

細胞内グルタチオン上昇作用を指標に活性成分を逆相 HPLC で分画し、最も活性のみられた画分を得た。活性のみられた画分のポジティブモードの LC-MS による精密質量分析および ¹H-NMR を測定した。

(4) アセトアミノフェン肝障害モデルマウスに対する有効性の検討

4 週齢 ICR 雄性マウスに 7 日間、黄ニラ抽出物を 0、25、100 mg/kg 経口投与した。アセトアミノフェン 700 mg/kg 腹腔内投与し、6 時間後に採血し、肝臓を採取した。なお、本研究は就実大学動物実験倫理委員会の承認を得て実施した。血清中の AST、ALT 活性は市販のキットを用いて測定した。肝臓はホモジナイズし、上清を過塩素酸で除タンパクした後、DTNB 法を用いてグルタチオン量を測定した。組織病理学的評価を行うために、採取した肝臓をホルマリン固定後、病理標本作製し、HE 染色を行った。

4. 研究成果

(1) 黄ニラ抽出物の部位別の細胞内グルタチオン上昇作用

黄ニラの廃棄部と可食部の細胞内グルタチオン量に対する影響を調べた結果、廃棄部および可食部ともに細胞内グルタチオン上昇作用があることが分かった (図 1)。また、露光処理の有無で比較すると、露光処理によりグルタチオン上昇作用がみられなくなり、青ニらつまり太陽光に当てて栽培したニラでは無処理のコントロール細胞と比べて有意差はなかった。以上の結果から、露光太陽光に暴露することにより、細胞内グルタチオン上昇活性成分が減少することが示唆された。

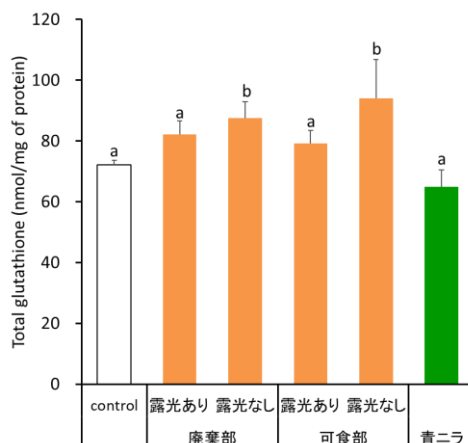


図 1 黄ニラ部位別の細胞内グルタチオン量への影響 (0.5 mg/mL、平均±SD、n=3、^{a,b}p<0.05)

(2) 黄ニラ抽出物による細胞内グルタチオン上昇メカニズムの解明

黄ニラ抽出物の添加による HepG2 細胞内グルタチオン上昇メカニズムを調べるために、xCT のタンパク質発現量を調べた。その結果、黄ニラ抽出物を添加することにより 8、24 時間後に 0 時間に比べて xCT の発現上昇がみられた。(図 2)。一方、HO-1 は 8 時間後から有意に上昇し、24 時間後では 0 時間と比較して 2 倍に上昇した。さらに、xCT や HO-1 の発現を制御している Nrf2 のタンパク質発現を調べた結果、核内の Nrf2 は 1 時間後から上昇がみられ、8、24 時間後に有意に上昇していることが明らかとなった (図 3)。以上の結果から、黄ニラ抽出物は Nrf2 の核移行を誘導し、下流の xCT や HO-1 の発現を誘導していることが示唆された。

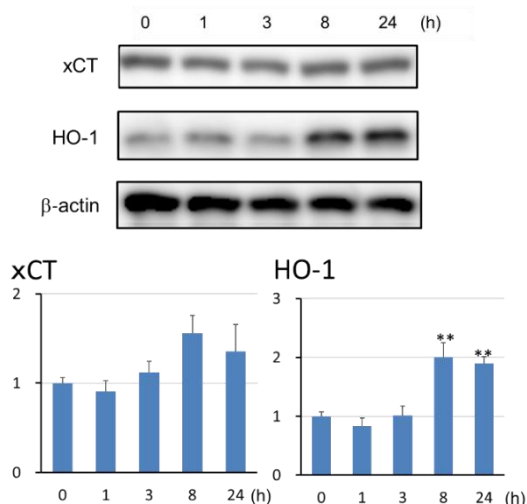


図 2 黄ニラ抽出物によるタンパク質発現への影響 (平均値±SE、n=3、**p<0.01 vs. 0 h)

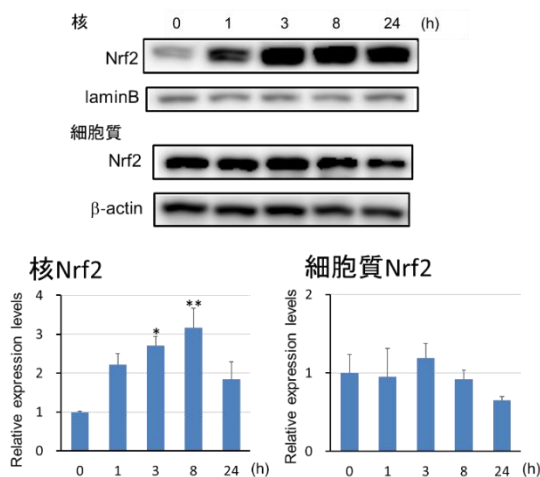


図 3 黄ニラ抽出物による Nrf2 の核移行への影響 (平均値±SE、n=3、*p<0.05、**p<0.01 vs. 0 h)

(3) 活性成分の同定、構造解析

黄ニラ抽出物を Sep-PakC18、さらに逆相 HPLC を用いて分画した。得られた画分について細胞内グルタチオン上昇作用を順次評価し、最も細胞内グルタチオン上昇作用のみられた画分を得た。活性のみられた画分のポジティブモードの LC-MS による精密質量分析を

行ったところ、特徴的な3つのピークを検出し、活性成分の質量は、208で、プロトン化したもの=209、Naイオンが付加したもの=231、208が2量体化して、プロトン化したもの=417であること、その元素組成は、 $C_7H_{12}S_3$ であることが推定された。データベースで検索すると、(Z)-10-devinylajoeene であることが示唆された。合成した(Z)-10-devinylajoeene と活性成分のMS/MS スペクトルデータが一致し、(Z)-10-devinylajoeene の 1H -NMR 分析から、シス体であることが明らかとなった。

(4) アセトアミノフェン肝障害モデルマウスに対する有効性の検討

マウスに APAP を腹腔内投与することにより、肝機能のマーカである AST、ALT は有意に上昇したが、黄ニラ抽出物をあらかじめ摂取することにより、濃度依存的に低下した(図4)。また、肝臓中のグルタチオン量は APAP 投与群と比較して、黄ニラ抽出物摂取群では上昇がみられた。さらに、黄ニラ抽出物の摂取により APAP による中心静脈周囲の肝細胞の壊死の抑制がみられた。次に、肝臓中の抗酸化酵素群の発現量を調べたところ、黄ニラ抽出物摂取により HO-1、NQO1、GPx、xCT、および、Nrf2 発現の誘導が見られた(図5)。以上の結果から、黄ニラ抽出物は Nrf2 を介して抗酸化酵素を誘導し、APAP 肝障害の抑制作用を示すことが示唆された。

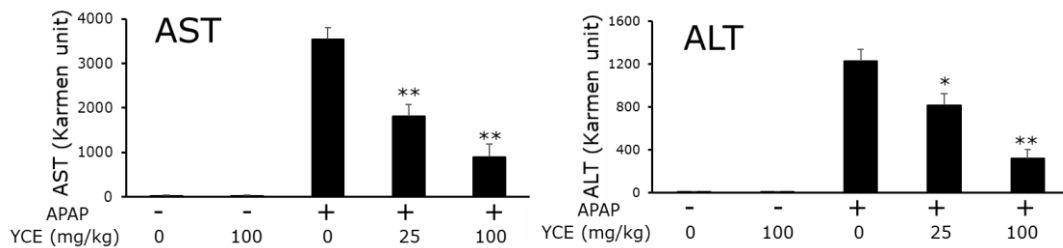


図4 黄ニラ抽出物による血清 AST、ALT 活性への影響

(平均値±SE、n=5、** $p < 0.01$ vs. APAP 群)

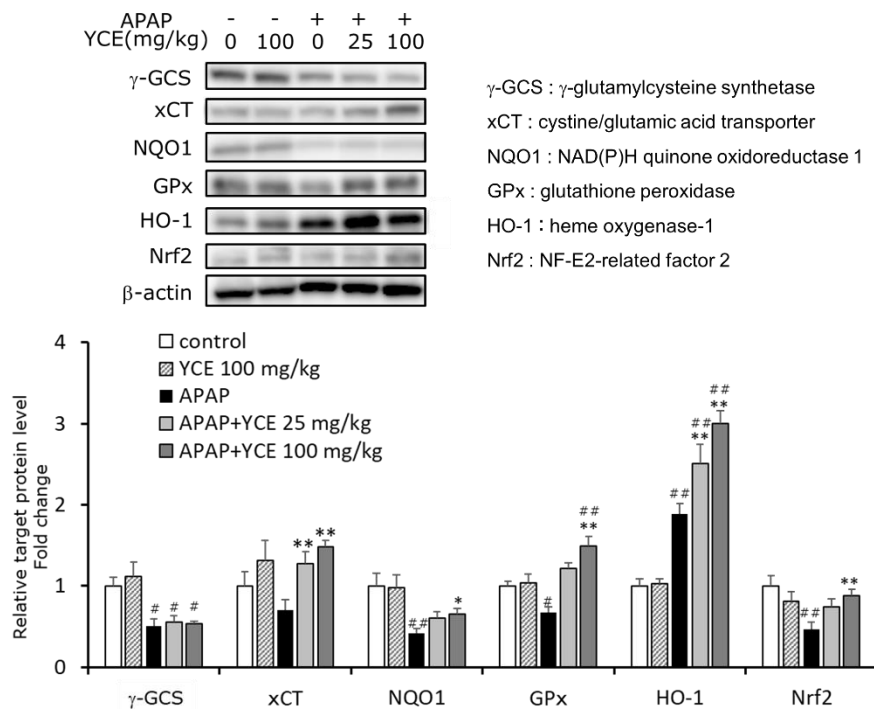


図5 肝臓の γ -GCS、xCT、NQO1、GPx、HO-1、Nrf2 タンパク発現量(平均±SE、n=5、* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ vs. APAP 投与群、# $p < 0.05$ 、## $p < 0.01$ vs.コントロール群)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 0件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 川上賀代子	4. 巻 53
2. 論文標題 黄ニラの細胞内グルタチオン上昇を介した肝臓保護作用に関する研究	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 アグリバイオ	6. 最初と最後の頁 993-996
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
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 -

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 川上賀代子, 森山圭, 植田輝義, 守谷智恵, 畑中唯史, 坪井誠二
2. 発表標題 黄ニラ抽出物の細胞傷害抑制メカニズムの解析
3. 学会等名 日本薬学会第143年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 川上賀代子, 森山圭, 畑中唯史, 坪井誠二, 守谷智恵
2. 発表標題 黄ニラの抗酸化活性と活性成分の同定
3. 学会等名 第96回日本生化学会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 川上賀代子, 森山圭, 植田輝義, 守谷智恵, 畑中唯史, 坪井誠二
2. 発表標題 黄ニラの細胞内グルタチオン上昇活性成分の同定
3. 学会等名 日本薬学会第142年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 川上賀代子, 森山圭, 守谷智恵, 畑中唯史, 洲崎悦子, 坪井誠二
2. 発表標題 黄ニラ抽出物の肝障害保護作用
3. 学会等名 第95回日本生化学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Kayoko Kawakami, Kei Moriyama, Chie Moritani, Tadashi Hatanaka, Seiji Tsuboi
2. 発表標題 Antioxidant effect of yellow Chinese chives extract via elevation of the intracellular glutathione levels
3. 学会等名 22nd International Congress of Nutrition (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 川上賀代子, 守谷智恵, 畑中唯史, 坪井誠二
2. 発表標題 黄ニラ抽出物の細胞内グルタチオン上昇作用およびそのメカニズムの解析
3. 学会等名 第74回日本酸化ストレス学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 守谷智恵, 川上賀代子, 畑中唯史, 坪井誠二
2. 発表標題 黄ニラ抽出物のグルタチオン上昇作用におけるKeap1-Nrf2経路の関与
3. 学会等名 第94回日本生化学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 川上賀代子, 守谷智恵, 植田 輝義, 畑中唯史, 坪井誠二
2. 発表標題 黄ニラ抽出物による睡眠ホルモン合成酵素の活性化
3. 学会等名 第93回日本生化学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 川上賀代子, 守谷 智恵, 畑中 唯史, 坪井誠二
2. 発表標題 黄ニラ抽出物の細胞傷害抑制作用
3. 学会等名 第74回日本栄養・食糧学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 守谷智恵, 川上賀代子, 畑中唯史, 坪井誠二
2. 発表標題 酸化ストレスに対する黄ニラ抽出物の細胞傷害抑制効果について
3. 学会等名 第73回日本酸化ストレス学会学術集会
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	坪井 誠二 (Tsuboi Seiji) (50172052)	就実大学・薬学部・教授 (35307)	

6. 研究組織（つづき）

	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	守谷 智恵 (Moritani Chie) (60253001)	就実大学・薬学部・教授 (35307)	

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