

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 31 日現在

機関番号：32622

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2012

課題番号：21700769

研究課題名（和文） 核酸摂取による関節リウマチの予防・改善効果に関する研究

研究課題名（英文） The Effect of Nucleoprotein diet to rheumatoid arthritis in mice.

研究代表者

養父 佐知子 (YOFU SACHIKO)

昭和大学・医学部・普通研究生

研究者番号：00398695

研究成果の概要（和文）：本研究は、リウマチ様関節炎を自然発症する Human T cell Leukemia Virus Type I (HTLV-1) 遺伝子導入(Tg)マウスに核酸・核タンパク (NP) 1.2%含有餌を3ヶ月間摂取させた。その結果、関節肥大、組織の増悪抑制や、NO酸化代謝物(3-ニトロチロシン)の低下が認められた。さらに、電子スピン共鳴法(ESR)を用いてNPが一重項酸素およびNO消去能を示すことをin vitroの実験で明らかにした。しかし、生体内に摂取された後のNPのフリーラジカルに対する作用は不明である。そこでリポポリサッカライド(LPS)誘導性肝傷害モデルマウスを作製しNP摂取の作用を調べた。その結果、NP摂取は過剰産生されたNOを直接消去するだけでなく、クッパー細胞の活性化抑制やiNOSタンパクの発現抑制により肝傷害を改善することが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：This study evaluated the effect of nucleoprotein from salmon soft roe on animal model of arthritis. Mice transgenic for human T-cell leukemia virus type I (HTLV-1 Tg) were divided into three experimental groups and supplemented on either nucleoprotein-free (nonNP), or 0.6% or 1.2% nucleoprotein mixed (NP0.6 or NP1.2) diet for 3 months. NonNP-diet HTLV-1 Tg mice increased an arthritis symptoms and RF. The symptoms were ameliorated in NP-diet groups. Macrophages detected by F4/80 staining, and oxidative metabolites in the serum and/or joints were clearly decreased in 1.2% NP-diet HTLV-1 Tg mice. Nucleoprotein and DNA-nucleotide, but less protamine, had direct anti-oxidative potency with BAP test and/or ESR in vitro. Then to evaluate the anti-oxidative potential of NP in vivo, lipopolysaccharide (LPS)-induced liver injury model which mediating NO production was evaluated. LowNP or 1.2%NP diet was fed for two weeks before LPS (30 mg/kg) i.p. injection into the C57BL. The serum ALT, 3-NT immunoreactivity, and NO level in 1.2%NP diet group were lower than lowNP diet group. These results suggest that NP suppress a LPS-induced liver injury associated with NO.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
2012年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：食生活学

キーワード：核タンパク、関節リウマチ、HTLV-1 Tg マウス、iNOS、肝傷害モデルマウス

## 1. 研究開始当初の背景

核酸はこれまで外科領域における輸液製剤として用いられており、新生児期の成長、免疫能、鉄吸収、小腸細菌叢、脂質代謝に対して効果が示されている(Nishimura. et al. *JJPEN*. 1993)。また、核酸塩基は抗酸化作用を有することが報告されている(Namiki. *J. Act. Oxyg. Free Rad.*. 1991)。本研究では、高齢者の健康を脅かす疾患のひとつである関節リウマチに着目した。関節リウマチは多発性関節炎を主徴とする自己免疫疾患のひとつであり、国内の患者数は約 60 万人と推定されている。関節リウマチの主症状は、微熱や倦怠感、体重減少、関節肥大などがあり、最終的に骨・軟骨が破壊され関節が変形し、高度の身体機能障害に至る。しかし、その病因・病態は未だに十分に解明されておらず、対処療法はあるものの根治的な治療法は確立されていない。関節の炎症部位では、TNF- $\alpha$  IL-1、IL-6 などの炎症性サイトカインが過剰かつ持続的に産生される。また、マクロファージや滑膜細胞より様々なフリーラジカルが発生し、その酸化ストレスにより組織障害が起こる。この様に、フリーラジカルが関節リウマチの悪化の原因のひとつであることが報告されている(Henrotin. et al. *Osteoarthritis and Cartilage*. 2003)。

現在、関節リウマチの治療薬はステロイド等の抗炎症剤、免疫抑制剤および抗 TNF- $\alpha$  抗体などの生物学的製剤が主に用いられているが、いずれも強い副作用がある。これらの副作用は患者やその家族の生活の質(QOL)の低下を引き起こす。それ故、病気の進行および薬剤の量を軽減できる機能性食品等による代替医療が必要とされている。

核酸塩基は抗酸化作用を有することが報告されていることから、核酸摂取によりフリーラジカルの発生を抑制し、関節炎の軽減や予防が可能なのではないかとの仮説を立てた。

## 2. 研究の目的

本研究は、核酸摂取による関節リウマチの予防・改善効果を明らかにすることを目的とする。

## 3. 研究の方法

(1)リウマチ様関節炎に対する効果

### ①核酸餌の投与

HTLV-1 Tg および野生型マウス(雄)を、6週齢時に無作為に3群に分けた(計6群)。それらの動物に対し、無核酸餌(NF)、核酸(NP) 0.6%もしくは1.2%含有した餌を6週齢から18週齢までの3ヶ月間自由摂取させた。餌投与期間中、1週間おきに体重、関節厚を計測した。

### ②関節厚計測

各餌投与群の関節厚を比較した。マウスの関節径は、デジタル式ノギス(クイックミニ、PK-1012、Mitutoyo)を用いて前肢(手首)と後肢(足首)の長・短径を計測した。計測は各餌与期間中(6~18週齢)、1週間おきに8回行った。関節厚は体重増加に伴う関節の成長を考慮し、関節計測値を体重で除しスコアを算出した。

### ③血清中 RF 値の測定

リウマチ様関節炎発症の際、血清中の RF 値が上昇することが知られている。そこで、核酸投与が RF 値にどのような影響を与えるか調べた。マウスは3ヶ月間の各餌投与後、解剖し心採血し血清を分離した。RF 値は市販されているレビス リウマチ因子 IgG 型マウス ELISA KIT(シバヤギ)にて、プレートリーダーを用いて測定し、各群で比較した。

### ④組織の形態的変化の評価

関節の組織学的変化を比較するため、ヘマトキシリン-エオシン(HE)染色とトルイジンブルー(TB)染色を行った。マウスは3ヶ月間の餌投与終了時に、ペントバルビタール(50mg/kg i.p.)の麻酔下で10%中性緩衝ホルマリン液にて還流固定し、前肢と後肢関節を摘出し通例の方法にて切片を作成した。染色後、山本らの報告に従い以下の様にグレード0~4の5段階に分けた。

グレード0:組織変化なし、1:滑膜細胞の肥厚、2:炎症性細胞の浸潤、フィブリノイドの浸潤、3:パンス形成、骨や軟骨の破壊、4:リンパ小節の形成、血管新生

### ⑤免疫組織学的評価

関節炎発症の際に発現する自己抗体(IgG)およびマクロファージ(F4/80)、関節炎発症の際に発現するフリーラジカルの代謝産物で、酸化障害のマーカーとして用いられている3-Nitrotyrosin(3NT)の免疫染色を行った。一次抗体はgoat anti-mouse polyvalent immunoglobulins(SIGMA), rat Murine F4/80 antigen(BMA biomedical), rabbit anti-mouse 3-NT(Upstate)を用いた。二次抗体はbiotinylated anti-goat IgG, biotinylated anti-rat IgG(vector)を用い、ABC法にて染色した。

### ⑥血清中 ROM の測定

フリーラジカルによる酸化ストレスとリウマチ様関節炎の関連について明らかにするため、活性酸素代謝物(ROM; reactive oxygen metabolite)を測定した。給餌終了時にマウスの心採血により得られた血清を用

いて d-ROMs TEST キットにて測定した。測定には、F.R.E.E. (Health & Diagnostics Limited Co., Italy) を用いた。

#### ⑦NP 餌中の抗酸化力 (BAP) 測定

餌に添加した核タンパクの抗酸化力を測定するため、F.R.E.E. を用いて Biological anti-oxidant potential (BAP) テストを行った。サンプルは、餌に添加した核酸・核タンパクとその主成分である DNA-Na、プロタミンの 3 種類について測定した。サンプルは超純水にて溶解し測定に用いた (最終濃度 25、50、75、250、750、2500  $\mu\text{g/ml}$ )。データはビタミン C 換算で  $\mu\text{M}$  として表す。

#### ⑧電子スピン共鳴 (ESR) 法によるフリーラジカルの測定

核酸・核タンパク餌が除去するフリーラジカルを同定するため、ESR 法を用いた。ESR 法は、電子スピンを有する物質である活性酸素やフリーラジカルの磁気的エネルギーを測る技術として知られている。磁場中において、不対電子のスピン遷移に伴うマイクロ波の吸収による共鳴現象を観測した。測定は ESR スピントラップ法を用いてスーパーオキシドアニオンラジカル ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ )、NO ラジカル ( $\text{NO}^{\cdot}$ )、一重項酸素 ( $^1\text{O}_2$ ) の 3 種について行った。サンプルは、餌に使用した核タンパクの原末を DMSO にて溶解し測定に用いた。

#### (2)肝傷害モデルマウスに対する効果

##### ①LPS 投与肝傷害モデルマウス作製

野生型マウス (雄) は、7 週齢時に無作為に 2 群に分けた。それらの動物に対し、NF 餌、NP1.2% 餌を 7 週齢から 9 週齢までの 14 日間自由摂取させた。マウスは、14 日間の給餌後 LPS30 mg/kg を腹腔内投与した。マウスは LPS 投与 6 時間後に頸椎脱臼し、直ちに肝臓を摘出して ESR 測定に用いた。LPS 投与 24 時間後にペントバルビタール (50 mg/kg i.p.) 麻酔下で心臓採血を行い、血清を分離した。血清は、ALT 測定 (Vetscan : セントラル科学貿易) に用いた。また、肝臓の一部はウエスタンブロッティング法と組織学的評価に用いた。

##### ②組織中の酸化ストレスの評価

マウスは 14 日間給餌後に LPS 投与し、24 時間後に肝臓を摘出した。10% 中性緩衝ホルマリン液に 1 週間浸漬固定した後、通例の方法によりパラフィンブロックを作成した。肝組織中のフリーラジカルの局在を確認するため、抗 3NT 抗体を用いて免疫染色を行った。一次抗体はウサギ抗 3NT 抗体 (Upstate Biotechnology, USA)、二次抗体はビオチン標識抗ウサギ IgG 抗体 (Santacruz, USA)

を用い、ABC、DAB 法により発色した。

##### ③組織中のクッパー細胞染色

LPS 誘導性肝傷害モデルでは、肝臓組織内のクッパー細胞が活性化することが知られている。そこで、抗 iba-1 抗体を用いてクッパー細胞の免疫染色を行った。切片は 10mM クエン酸液にて 85°C、20 分間前処理をした。一次抗体はウサギ抗 iba-1 抗体 (Wako, Japan)、二次抗体はビオチン標識抗ウサギ IgG 抗体 (Santacruz, USA) を用い、ABC、DAB 法により発色した。

##### ④iNOS とクッパー細胞の二重免疫染色

NO 合成酵素である iNOS を発現している細胞を同定するため、蛍光抗体法にて二重免疫染色を行った。一次抗体はウサギ抗 iNOS 抗体 (Millipore, USA) とラット抗 F4/80 抗体 (BMA, USA) を用い、二次抗体は Alexa546 標識抗ウサギ IgG 抗体 (Invitrogen, USA) と Alexa488 標識抗ラット IgG 抗体 (Invitrogen, USA) を用いた。最後に DAPI にて核染色を行った。

##### ⑤電子スピン共鳴 (ESR) 法による肝組織中の NO ラジカルの測定

核酸・核タンパク餌摂取後の肝組織中の NO ラジカルを ESR 法にて測定した。マウスは、14 日間各餌を給餌し、LPS を腹腔内投与した。解剖 30 分前に NO ラジカルトラップ剤として 200 mM N-Methyl-D-glucamine dithiocarbamate sodium salt (MGD; Dojin Co., Kumamoto, Japan) と 200 mM ferrous sulfate ( $\text{FeSO}_4$ ) を 3:1 に混合した溶液をマウスの体重 20 g あたり 0.4 ml ずつ腹腔内投与した。その 30 分後 (LPS 投与 6 時間後) に肝臓を 50 mg 摘出した。肝臓は扁平セルに挟み込み、マイクロウェーブ (16mW, 5mT, gain1250; time constant, 0.1second) 照射し、ESR 測定装置にて発生した NO ラジカルを測定した。

##### ⑥Western blotting 法

核酸・核タンパク摂取後の肝臓内における NO ラジカル合成酵素 (iNOS) の発現量の変化をウエスタンブロッティング法により解析した。手法は大滝らの報告に準じた

(Ohtaki H *et al.* PNAS. 2006)。各動物は 2 週間 NF もしくは 1.2% NP 餌を給餌し、LPS30 mg/kg 腹腔内投与し肝傷害モデルを作製した。その 24 時間後にペントバルビタール (50 mg/kg i.p.) の麻酔下にて肝臓を摘出し、溶解バッファー中でホモジェナイズした。50  $\mu\text{g/lane}$  にて SDS-PAGE を行い、PDVF 膜に転写後、1% スキムミルクにてブロッキングを行なった。その NO ラジカル合成酵素である、iNOS に対する 1 次抗体、続いて HRP

標識 2 次抗体を反応させ、化学発光法により X 線フィルム上に感光させた。フィルムはスキャナーにて取り込み、画像解析ソフト (UN-SCAN IT gel) によりシグナル強度を定量化した。標準サンプルとして LPS 投与 24 時間後の肝臓サンプルを同時に泳動し、そのシグナル強度を 100 として各サンプルのシグナル強度を算出した。

#### 4. 研究成果

##### (1) リウマチ様関節炎に対する効果

##### ① 関節の肥大抑制効果

HTLV-1 Tg マウスにおいて関節リウマチに特有の体重減少 (fig.1) および関節肥厚 (fig.2) がみられたが、NP 群においてそれらは抑制された。

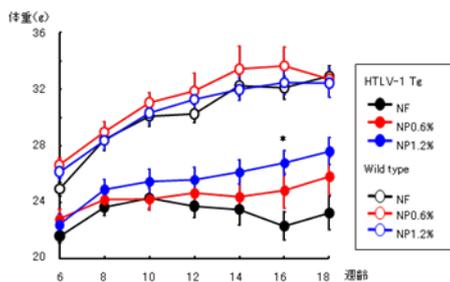


Fig.1 野生型およびHTLV-1 Tgマウスにおける餌負荷期間中の体重の経時的変化

\*: p<0.05 vs NP HTLV-1Tg

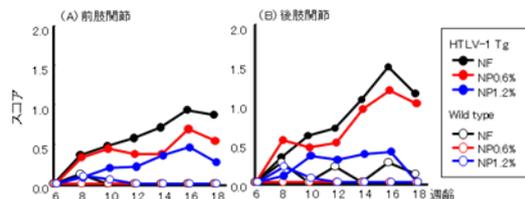


Fig.2 野生型およびHTLV-1 Tgマウスにおける餌負荷期間中(6-18週齢)の関節肥大のスコア

##### ② 関節の組織学的変化

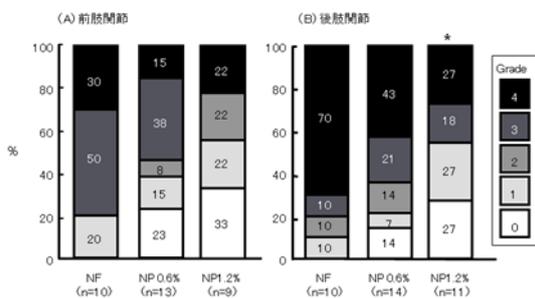


Fig.3 餌負荷終了後(18週齢)におけるHTLV-1Tgマウスの組織変化

\*: p<0.05 vs NF HTLV-1Tg (Tukey)

組織学的検討により HTLV-1 Tg マウスはリウマチ様関節炎の悪化に伴い滑膜細胞の肥厚、軟骨の破壊、パンス (肉芽腫) 形成、血管新生等の形態的变化が認められた。この組織

学的所見をスコア化した結果、NP 群は NF 群に比べて有意に低下した (fig.3)。

また IgG 染色により NF 群では関節滑膜に IgG 沈着が認められたが NP 群では IgG 沈着が軽減していた (fig.4)。

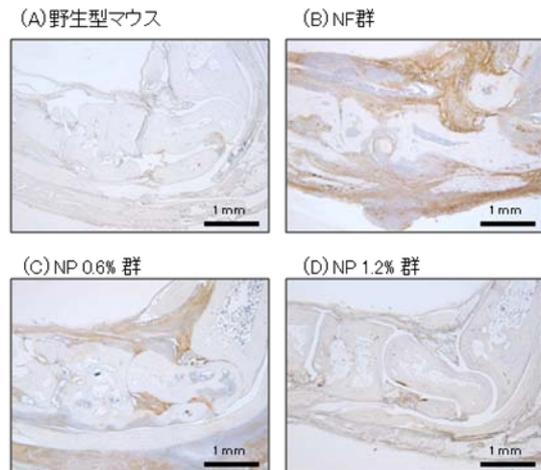


Fig.4 餌負荷終了後(18週齢)におけるHTLV-1 Tgマウスの後肢関節組織のIgG染色の比較

##### ③ 血清中 Rheumatoid Factor (RF) 値

関節リウマチの指標のひとつである血清中 RF 値を調べた。NF 群は野生型と比較して高値を示した。一方、NP1.2%群は有意な差ではなかったが、NF 群より低値を示した。

##### ④ 酸化ストレスの評価

マウスの関節組織の 3-nitrotyrosine (3NT) 免疫染色を行った。3NT 陽性反応は、野生型マウスではほとんど認められなかった (Fig. 5A) が、HTLV-1 Tg マウスでは軟骨細胞に強い陽性反応が認められた (Fig. 5B)。それに対し、NP1.2%群ではその陽性反応がほとんど認められなかった (Fig. 5C)。

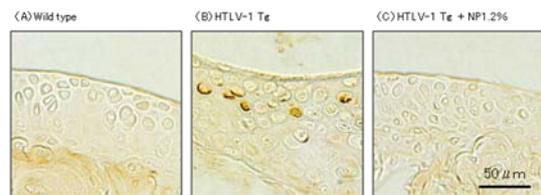


Fig.5 マウス後肢関節の3-Nitrotyrosine染色

次に、給餌終了後のマウス血清中の ROM 値を測定した。NF 群に対し、NP 濃度依存的に ROM 値は低下し、特に NP1.2%群で有意差が認められた (Fig. 6)。これらより NP 摂取による酸化ストレスの軽減が関節炎の抑制機構である可能性が示唆された。

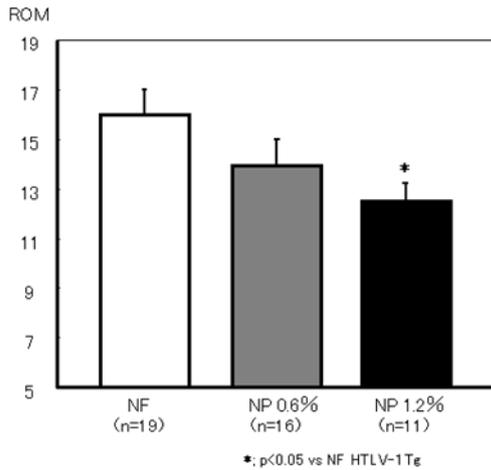


Fig6 餌負荷終了後(18週齢)の血清中ROM

### ⑤核酸・核タンパクの抗酸化力 (BAP)

次にNPの抗酸化作用を *in vitro* にて評価した。NPとその主成分であるDNA-Na、プロタミンの3種の抗酸化能(BAP)テストを行ったところ、NPのBAP値は濃度依存的に増加し50  $\mu\text{g/ml}$  で有意差を認めた(fig. 7)。また、DNA-Naは25  $\mu\text{g/ml}$  で有意に高値を示した。この結果より、NP摂取による関節炎の抑制作用は主にDNA-Na成分によるものだという事が明らかとなった。

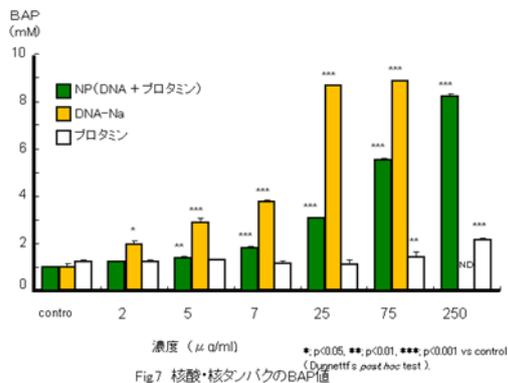


Fig7 核酸・核タンパクのBAP値

### ⑥ESRによるフリーラジカルの測定

電子スピン共鳴法を用いてNPが消去するフリーラジカル種を同定した。測定はNOラジカル、スーパーオキシドアニオン、一重項酸素を対照に行った。その結果NPはNOラジカルを6  $\text{mg/ml}$  で40%、一重項酸素を0.01  $\text{mg/ml}$  で95%以上消去したが、スーパーオキシドアニオンはほとんど消去しなかった。以上の結果より、NPは一重項酸素およびNOラジカルを消去し抗酸化能を示すことが明らかとなった。

### (2)肝傷害モデルマウスに対する効果

#### ①肝臓の酸化障害の評価

生体内に摂取された後の核タンパクのフリーラジカルに対する作用は不明である。そこ

で次にリポポリサッカライド(LPS)誘導性肝傷害モデルマウスを作製し、NOが原因となって生じる肝傷害に対する核タンパク摂取の作用を調べた。LPS誘導性肝傷害後の酸化傷害領域の局在とNP摂取による影響を評価するため、抗3NT抗体を用いて免疫染色を行った。3NT陽性反応は、LPS投与24時間後のNF群の肝臓の中心静脈周囲に認められた(fig. 8-A)。しかし、その陽性反応は1.2%NP群ではほとんど認められなかった(fig. 8-B)。

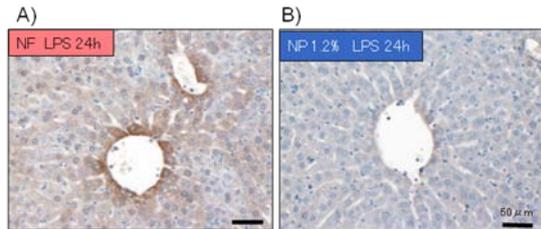


Fig8 肝組織中の酸化傷害マーカー(3NT)免疫染色像  
-LPS30mg/kg 腹腔内投与24時間後-

次に、電子スピン共鳴(ESR)法を用いて肝組織中のNOラジカルを測定した。NOラジカル強度は、NF群は $1.1 \pm 0.11$ だった。それに対し、1.2%NP群は $0.9 \pm 0.19$ と低値を示した。

#### ②肝臓におけるクッパー細胞とiNOS発現の評価

抗iba-1抗体を用いてLPS投与後の肝臓組織におけるクッパー細胞の免疫染色を行った。Iba-1陽性反応は全ての群で肝細胞周囲の類洞で認められた。LPS投与24時間後のNF群は、iba-1陽性細胞が肥大化していたが、それに対し1.2%NP群は肥大化した像はほとんど認められなかった。さらに、クッパー細胞におけるiNOS発現を確認するため、蛍光二重免疫染色を行った。クッパー細胞マーカーであるF4/80免疫陽性反応(fig. 9-A)とiNOS

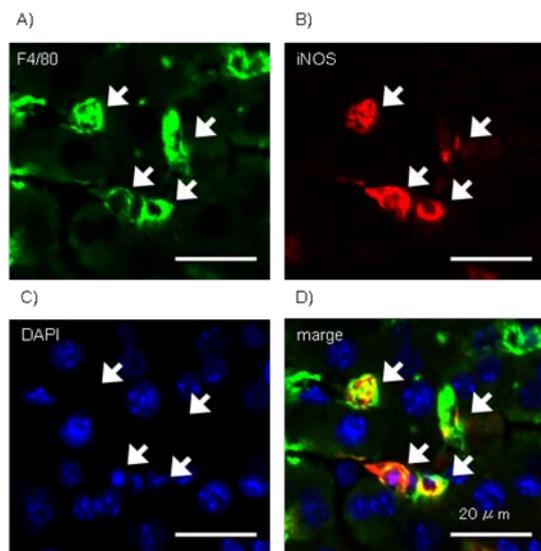
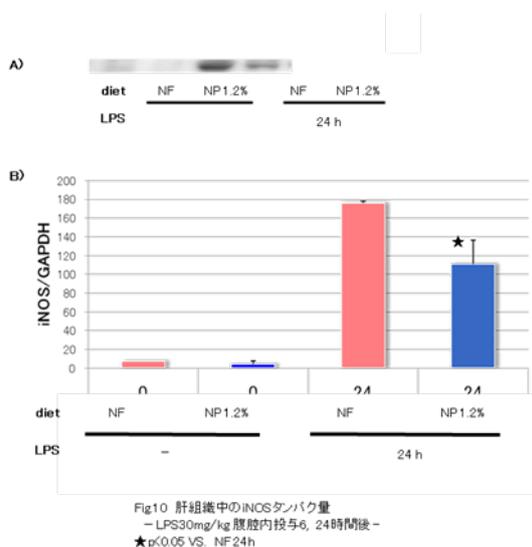


Fig9 クッパー細胞(F4/80抗体)とiNOSの二重免疫染色

免疫陽性反応 (fig. 9-B) は矢印の細胞で共有した (fig. 9-D)。

### ③ウエスタンブロッティング法による iNOS 発現量の評価

次に、核酸・核タンパク摂取後の肝臓内における NO ラジカル合成酵素 (iNOS) の発現量をウエスタンブロッティング法により解析した。LPS 非投与群は、NF 群 ( $7.6 \pm 3.0$ ) と 1.2%NP 群 ( $4.6 \pm 2.0$ ) とともに iNOS の発現はほとんど認められなかった。一方、LPS 投与 24 時間後は NF 群  $176.0 \pm 25.1$  に対し、1.2%NP 群は  $111.1 \pm 12.1$  と有意に減少した (fig. 10-AB)。



これらより、NP 摂取は過剰産生された NO を直接除去するだけでなく、クッパー細胞の活性化抑制や iNOS タンパクの発現抑制により肝傷害を改善することが明らかとなった。

以上の結果より、核酸・核タンパクの摂取は関節リウマチのみならず、フリーラジカルが関係する疾患に対し、予防・改善効果が期待される。

### 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 2 件)

- 1) 養父佐知子、小川哲郎、中町智哉、佐藤和恵、清水 藍、松永政司、塩田清二: LPS 誘導性肝傷害モデルマウスに対する核酸・核タンパク摂取の効果. 日本臨床生化学会誌, 査読有、40:137-143, (2010).
- 2) Ohtaki H, Yofu S, Nakamachi T, Satoh K, Shimizu A, Mori H, Sato A, Iwakura Y, Matsunaga M, Shioda S. Nucleoprotein Diet Ameliorates Arthritis Symptoms in Mice Transgenic for Human T-Cell Leukemia

Virus Type I (HTLV-1). J Clin Biochem Nutr. 査読有、46: 93-104. (2010).

[学会発表] (計 3 件)

- 1) 養父 佐知子, がん細胞に対する核タンパクの細胞増殖抑制効果、第 118 回日本解剖学会総会、2013. 3. 30、(香川)
- 2) 養父 佐知子, 肝臓の網羅的遺伝子発現解析による核タンパク栄養の効果の検討、第 117 回日本解剖学会総会、2012. 3. 26、(山梨)
- 3) 養父 佐知子, LPS 誘発肝傷害モデルマウスに対する核タンパク摂取の効果、第 115 回解剖学会総会、2010. 3. 28 (盛岡)

[図書] (計 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 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 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

養父 佐知子 (YOFU SACHIKO)  
昭和大学・医学部・普通研究生  
研究者番号：00398695

(2) 研究分担者

( )  
研究者番号：

(3) 連携研究者

( )  
研究者番号：