

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 6 月 8 日現在

機関番号：24405

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2022

課題番号：21K13502

研究課題名（和文）クレソンに含まれる抗炎症成分の作用機序の解明

研究課題名（英文）Anti-inflammatory mechanisms of 1,3-diphenethylurea in watercress

研究代表者

中屋 慎（Nakaya, Makoto）

大阪公立大学・研究推進機構・客員研究員

研究者番号：90736886

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：葉菜類クレソンは1,3-ジフェネチルウレア（PE-UR）を含有する。生体内で炎症を制御する脂質メディエーター（LM）に着目し、培養細胞を用いてLMに対するPE-URの作用を解析したところ、CYP経路に属する抗炎症LMである14,15-EETがPE-UR添加量依存的に増加することが分かった。14,15-EETは可溶性エポキシヒドロラーゼ（sEH）の基質であり、代謝されて炎症LMとなる。本研究により、PE-URはsEHを阻害することにより抗炎症LMの14,15-EETを増加させることが示された。このPE-URによるsEH阻害がクレソンの喫食により齎される抗炎症効果の主たる作用機序だと考えている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

クレソンは欧米において伝統的に健康増進目的で食されているが、抗炎症効果を齎す機能性成分とその作用機序に科学的根拠が付与されていない。本研究の成果は、PE-URが機能性成分であることを、その作用機序と合わせ明確に示すものであり、食品の機能を評価する食生活科学の発展に貢献する。また、本研究の成果は、食品がもつ健康増進効果に明確な科学的根拠を提示する一例であり、伝統的な食品の価値を改めて社会に発信するものである。健康増進効果に着目した農作物の選択肢を消費者に提供し、国民の食生活をさらに豊かにする一助となる。

研究成果の概要（英文）：Watercress (*Nasturtium officinale*), a leafy vegetable, contains 1,3-diphenethylurea (PE-UR). Focusing on the lipid mediators (LM) that control inflammation in vivo, we comprehensively analyzed the changes in LM by adding PE-UR to cultured cells and revealed that 14,15-Epoxyeicosatrienoic acid (14,15-EET), an anti-inflammatory material belonging to the CYP pathway, was increased in a dose-dependent manner. 14,15-EET is a substrate for soluble epoxyhydrolase (sEH) which metabolizes inflammatory LM. These results suggest that PE-UR increases the concentration of 14,15-EET, an anti-inflammatory LM, by inhibiting sEH. We believe that the sEH inhibition by PE-UR is the main mechanism underlying the anti-inflammatory effects of watercress ingestion.

研究分野：食生活科学

キーワード：クレソン 抗炎症効果 ジフェネチルウレア 可溶性エポキシヒドロラーゼ阻害

## 1. 研究開始当初の背景

クレソンはヨーロッパ原産のアブラナ科植物である(図1)。日本では香味野菜として肉料理の付け合わせなどとして少量食されるのが一般的だが、欧米では伝統的に健康増進目的で食されている<sup>1,2)</sup>。



- *Nasturtium officinale*
- アブラナ科オランダガラシ属
- ヨーロッパ原産
- 健康増進効果を持つとして伝統的に食されてきた  
効能例：ニキビ、高血圧、皮膚炎、脱毛、etc.

細胞レベルの炎症を抑制しているのでは?

図1. クレソンの外観と特徴

Guarrera らが報告したイタリアにおける伝統的な食用植物の健康増進効果に関する総説では、クレソンは皮膚炎の緩和など13項目の効能が挙げられている<sup>1)</sup>。しかし、現在の栄養学・食品科学的知見からこれらの効能を説明することはできず、クレソンを有効活用するために必要な科学的根拠が乏しい。我々は、これらの効能の多くは細胞レベルでの炎症反応であることに注目し、クレソンに含まれる機能性成分が細胞の炎症を抑制することで様々な効能が表れると仮説を立て研究を進めている。

体内で炎症を制御する脂質メディエーターとして、n-6系脂肪酸であるアラキドン酸から生成されるエイコサノイドが知られている(図2)。チトクロームP450(CYP)経路に存在する可溶性エポキシドヒドロラーゼ(sEH)の阻害物質のひとつに1,3-ジフェネチルウレア(PE-UR)がある<sup>3)</sup>。これまでの研究から、クレソンにはPE-URが微量成分として存在し、強いsEH阻害活性を示すことを突

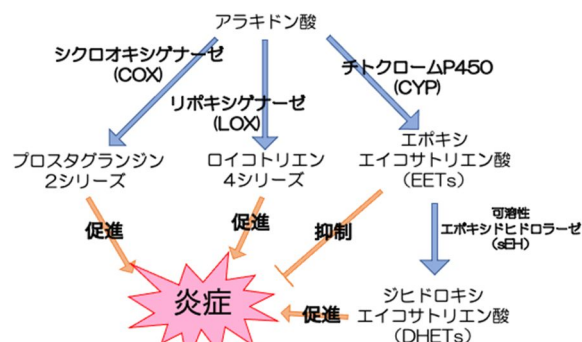


図2. アラキドン酸由来エイコサノイドと炎症の関係

止めた。また、PE-URを摂取したマウスの肝臓においてsEH阻害によると考えられるエポキシエイコサトリエン酸(EETs)の増加が起こることを明らかにした。さらに脂質メディエーターを網羅的に解析したところ、リポキシゲナーゼ(LOX)やシクロオキシゲナーゼ(COX)の代謝物であり炎症促進的に働く脂質メディエーターの量が低減することを発見した。この発見はクレソンの高機能野菜としての価値を高めるものであり、その作用機序を明らかにすることは機能性の科学的根拠を明確に示すために重要である。しかしながら、マウスを用いた動物実験から得られた結果は、各組織における炎症反応の総和であり、PE-URの細胞内における作用機序を示すものとは言えない。

## 2. 研究の目的

これまでの研究から、クレソンに含まれる微量成分PE-URはsEH阻害活性により抗炎症作用を示す可能性を見出し、動物実験から、PE-URはsEHが関与するCYP経路だけでなくCOXやLOX経路の炎症系エイコサノイドにも広く影響を与えることが示唆された。しかし、動物は生じた炎症に対し自己修復を行うため、動物実験の結果のみでエイコサノイドの変化を全てクレソンやPE-URに帰着させることはできない。PE-URの影響を正確に評価するためには個体をより単純化した培養細胞実験系での検証が必要である。そこで、本研究では、培養細胞実験系を用いて、単一細胞系が産生するエイコサノイドを網羅分析し、PE-URの抗炎症効果の作用機序を明らかにする

ことを目的とした。

本研究は、「抗炎症作用を持つ野菜」について明確な学術的根拠を示すものであり、食品に含まれる新規微量成分の機能性に関する研究として価値がある。これまでの学術的解釈ではクレソンを含むアブラナ科植物の機能性成分としてイソチオシアネート類のみが知られている<sup>4)</sup>。本研究は、新たに微量成分であるウレア類を抗炎症成分として科学的根拠と共に提示するものである。

### 3. 研究の方法

これまでの研究から、PE-UR は sEH が関与する CYP 経路だけでなく、COX や LOX 経路の炎症系エイコサノイドにも影響を与えることを見出した。一般的に、エイコサノイドは細胞種により産生される種類が異なる上、産生細胞の周囲に限定的に作用することから、作用機序を調べるためには、生命反応の複雑な個体では無く、より単純化した単一細胞系を用いた評価が適している。そこで、マスト細胞を用いた培養細胞系により PE-UR の作用機序の解明を行なった。マスト細胞は、体内に広く分布している生体防御機構に関与する細胞であり、エイコサノイド等の脂質メディエーターを産生・放出することで体内の炎症反応を制御している。

本研究では、マウス由来マスト細胞 PB-3c に PE-UR を添加し、産生された脂質メディエーターを HPLC-MS<sup>2</sup> 法により網羅的に解析した。マスト細胞増殖因子である IL-3 存在化で培養した PB-3c を 50  $\mu$ M アラキドン酸含有培地で 48 時間培養した後、PBS で洗浄し、 $2 \times 10^6$  cells 毎に分けた。それぞれの細胞群にエタノールに溶解させた PE-UR を終濃度 0, 25, 50, 100, 150  $\mu$ M となるよう添加し、5  $\mu$ M カルシウムイオノフォアを用いて 20 分間細胞を刺激した。その後、細胞懸濁液を回収して細胞を破碎し、逆相系ポリマーによる固相抽出法により脂質メディエーター分析試料を得た。脂質メディエーターの網羅的分析では、C8 カラムを備えた LC-8060 (Shimadzu) による MRM 測定から得られたデータを Traverse MS (Reif ycs) にて解析した。測定した脂質メディエーターは、LC/MS/MS メソッドパッケージ 脂質メディエーター ver. 3 (Shimadzu) に記載されている 196 種である。

### 4. 研究成果

マウス由来マスト細胞 PB-3c に PE-UR を添加し、産生される脂質メディエーター 196 種を測定したところ、sEH の基質であり抗炎症作用を示す EETs の一つ 14,15-EET が見出された。PE-UR を 25  $\mu$ M 添加した場合の 14,15-EET 産生量は 0  $\mu$ M の 1.3 倍であり、150  $\mu$ M 添加した場合は、1.8 倍であった。産生量の上昇は PE-UR 添加量と正の相関があり、25  $\mu$ M という僅かな濃度においても産生量の上昇がみられた。EETs 産生量の上昇は、PE-UR による sEH 阻害の結果齎されたものと考えている。クレソンに含まれる既知の抗炎症成分であるフェネチルイソチオシアネート (PE-ITC) を同様に分析した

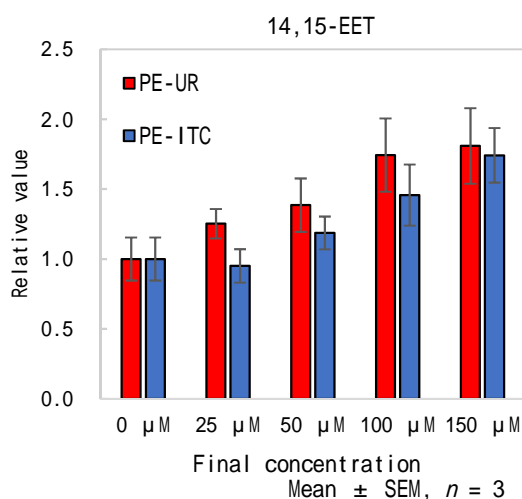


図3. PE-UR 及び PE-ITC を添加した場合の 14,15-EET 産生量 (0  $\mu$ M 添加時を 1.0 とした相対値)

ところ、添加量依存的な産生量の上昇は見られたものの、いずれの添加量においても PE-UR に比べ低い傾向にあった。特に、25  $\mu$ M 添加時に産生量が増加した PE-UR と異なり、PE-ITC では産

生量の増加がみられなかった。我々が過去に行なった *in vitro* におけるヒト由来 sEH の阻害活性試験では、PE-ITC は阻害活性を示すものの PE-UR に比べ低い阻害活性であったことから、今回の 14,15-EET 産生量における PE-UR と PE-ITC の差異は、これらの物質の阻害活性の差によるものと考えている。

PE-UR 添加量依存的に産生量が変化する脂質メディエーターとして、12-ヒドロキシエイコサテトラエン酸(12-HETE)が見出された。12-HETE はアラキドン酸が 12-リポキシゲナーゼにより代謝されることで産生され、炎症促進的に作用することが知られている<sup>5)</sup>。興味深いことに、PE-ITC では添加濃度に関係なく、0  $\mu\text{M}$  添加時の 1.8 倍程度産生されたが、PE-UR では 100  $\mu\text{M}$  添加時で 0  $\mu\text{M}$  添加時の 0.7 倍、150  $\mu\text{M}$  添加時で 0.4 倍と産生量は添加量依存的に減少傾向であった。この結果は、PE-UR を摂取させたマウスの肝臓において 12-HETE 産生量が低減した過去の結果と一致する。しかしながら、5-

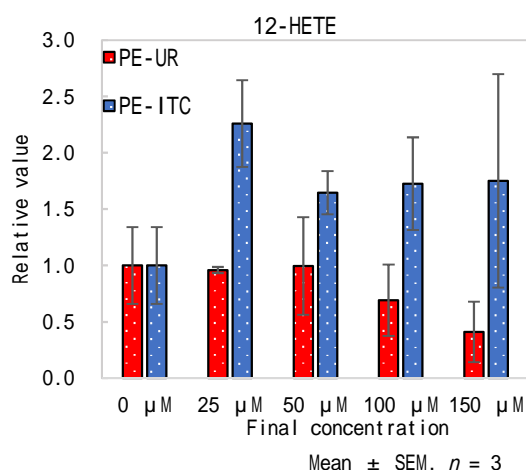


図4. PE-UR 及び PE-ITC を添加した場合の 12-HETE 産生量 (0  $\mu\text{M}$  添加時を 1.0 とした相対値)

LOX や 15-LOX といった他の LOX アイソザイムにより産生する脂質メディエーターには添加量依存的な変動はみられなかったことから、PE-UR が LOX 経路に作用するとは言えないと考えている。ただ、PE-UR が 12-LOX を特異的に阻害する可能性は否定できないため、さらなる検討が求められる。なお、COX 経路に属する脂質メディエーターには添加量依存的な変動を示す物質は認められなかった。

以上のように、脂質メディエーターによる炎症制御産生における PE-UR の作用機序をマウス由来マスト細胞を用いて検討したところ、PE-UR は CYP 経路に関与する sEH の基質であり、抗炎症作用を示す 14,15-EET 産生量を増加させることが分かった。また、LOX 経路や COX 経路に属する脂質メディエーターに顕著な変動は見られなかった。これらの結果は、sEH の阻害が PE-UR の抗炎症効果の主たる作用点であることを意味する。これまでの知見と合わせ、葉菜類クレソンが示す抗炎症効果は、微量成分 PE-UR の sEH 阻害により、抗炎症効果をもつ EETs の産生量が増加するためであると考察している。

## 参考文献

- 1) P. M. Guarrera, V. Savo (2013) *J. Ethnopharmacology*, 146, 659-680.
- 2) J. D. Noia (2014) *Preventing Chronic Disease*, 11, E95.
- 3) Kitamura S. *et al.* (2017) *PLoS ONE*, 12, (5) e0176571.
- 4) Y. J. Kim *et al.* (2015) *PLoS ONE*, 10, (8) e0132151.
- 5) M. Gabbs *et al.* (2015) *Adv. Nutr.*, 6, 513-40.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 中屋慎, 濱野未宇, 瀬尾朱未, 北村進一
2. 発表標題 クレソンに含まれる1,3-ジフェネチルウレアの摂取がマウス脂質メディエータに与える影響
3. 学会等名 日本農芸化学会2022年度大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 中屋慎, 北村進一
2. 発表標題 クレソンに含まれる新規機能性成分1,3-ジフェネチルウレアの可溶性エポキシヒドロラーゼ阻害活性
3. 学会等名 日本農芸化学会2023年度大会
4. 発表年 2023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
研究協力者	北村 進一  (Kitamura Shinichi)  (60117869)	大阪公立大学・研究推進機構・特任教授   (24405)	
研究協力者	金子 幸弘  (Kaneko Yukihiro)  (90469958)	大阪公立大学・大学院医学研究科・教授   (24405)	

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
研究協力者	藤原 永年  (Fujiwara Nagatoshi)  (80326256)	帝塚山大学・現代生活学部・教授     (34601)	

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