

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 9 月 25 日現在

機関番号：34439

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2011～2013

課題番号：23500941

研究課題名(和文)生活習慣病の改善に関する食品中の新規機能性成分の探索

研究課題名(英文) Investigation of food constituents with unique functions effective on lifestyle diseases

研究代表者

日沼 州司 (Hinuma, Shuji)

千里金蘭大学・生活科学部・教授

研究者番号：60550522

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：マクロファージ抑制活性を有する食品成分の探索を行った。その中でクルクミンは細胞培養系で最も強いマクロファージ抑制活性を示した化合物であった。そこでクルクミンのリポソーム化を行った。アルブミンとクルクミンの複合体をリポソーム化することにより、マクロファージの抑制に十分な量のクルクミンを内包化したリポソームを調製することができた。フローサトメトリーの解析により、マウス腹腔内投与した、クルクミン内包化リポソームは、マクロファージに選択的に取り込まれて、マクロファージ機能を抑制することを見出した。クルクミン内包化リポソームが、マクロファージの選択的な抑制に有用であることを明らかにすることができた。

研究成果の概要(英文)：We screened food constituents suppressing macrophages. Curcumin was one of the strongest compounds exhibiting suppressive effects on macrophages. We eventually succeeded in preparing liposomes with sufficient amounts of curcumin to suppress macrophages by incorporating a complex of curcumin and bovine serum albumin. After intraperitoneal administration of the liposomes containing curcumin into mice, these were incorporated mainly by macrophages, and as a result macrophage function was suppressed. Our study indicates that the liposomes containing curcumin are safe and useful for the selective suppression of macrophages.

研究分野：総合領域

キーワード：食品機能成分 マクロファージ クルクミン リポソーム

## 1. 研究開始当初の背景

食品成分の機能性については、食を通じた健康増進の観点から、近年注目を集めている。実際、食品の機能性に着目した、特定保健用食品などが多く開発され、それを強調した食品も市販されるようになってきた。食品の機能性とは、医学や薬学の分野から見た場合には、特定の物質の有する生理作用・生理活性・薬理活性と言い換えることができる。医学・薬学領域では、これまで多様な物質の有用な活性について広く探索が行われてきたが、食物の分野では、生理活性物質の探索的手法はこれまで、あまり応用されてこなかった。その理由としてはこれまで、食品成分中にあまり強力な生理活性物質が見つかってきていないことや天然物は、活性物質が見つかってからもその後、誘導体などの合成が難しい場合が多いなどの理由があげられる。しかし食品成分は長く人類が摂取してきた物質であり、比較的生体に対する安全性、忍容性が高いことが期待できる。したがって食品中の様々な機能成分の探索を進めることにより、*in vivo* で安全に使用できて、現在、国民の健康上の重要な課題となっている生活習慣病の予防・治療に役立つ生理機能調節物質を見つけることができると期待される。

## 2. 研究の目的

(1) 本研究では食品成分の中から、生活習慣病の予防・治療・改善に役立つと思われる機能性成分の探索を進める。この探索では、どのような食品にどのような機能成分が含まれているかは未知の状態からスタートするため、1次スクリーニングの食品サンプルの調製とスクリーニングに使う測定系の組み合わせによって、陽性サンプルを見出すことが最初の関門となる。したがって最初はある程度、網羅的な組み合わせによる予備検討を実施する。具体的には例えば、癌・糖尿病・動脈硬化の進行にマクロファージが関与していることが知られているので、マクロファージの活性化抑制物質の探索を実施する。  
(2) 候補化合物が見つかった場合には、*in vitro* 細胞培養系での活性を確認し、最終的には *in vivo* マウスでの作用を確認する。

## 3. 研究の方法

(1) スクリーニング用の食品成分サンプルの調製：味噌、梅干、納豆等について、エタノール抽出物および水抽出物を調製した。抽出後、エバポレーターにより濃縮、乾燥させ、少量のPBSにサンプルを溶解し、遠心により沈殿物を除いたものを1次スクリーニング用のサンプルとした。また既知化合物については試薬を購入し、サンプルとした。  
(2) 細胞増殖抑制試験：THP-1、マウス骨髄からM-CSFを用いて調製した初代培養マク

ロファージ、L929 (マウス繊維芽細胞株)、RAW264.7 (マウスマクロファージ細胞株) を使用し、formazanの原理を利用した生細胞発色法 (WST-8) による細胞増殖試験により各種サンプルの抑制効果を調べた。

(3) 強いマクロファージ抑制活性が見つかった食品成分のクルクミンについて、マクロファージへの選択的な送達を行うためリポソーム化の検討を実施した。

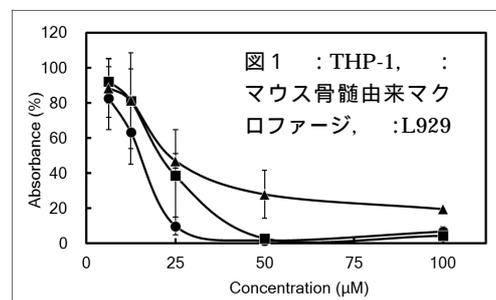
(4) 調製したクルクミン含有リポソーム (クルクミン/リポソーム) について粒子径その他の性状解析をZetasizer nano ZSPを使って行った。

(5) クルクミン/リポソームの *in vivo* マウス投与による取り込み細胞の細胞表面抗原の解析は、flow cytometry (Guava easyCyte6) により行った。

(6) マウス腹腔細胞の培養上清中のIL-6はELISAキットを利用して測定した。

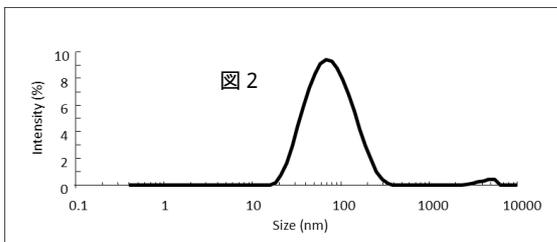
## 4. 研究成果

(1) 食品由来の機能成分の探索を目的に、味噌を含む複数の食品からエタノールおよび水抽出物を調製し、THP-1 に対する増殖抑制活性を調べた。その結果、味噌の抽出液に抑制活性が検出された。そこで、まずは食品成分として知られている既知化合物について、THP-1、L929、マウス骨髄由来マクロファージについて数十種の化合物のスクリーニングを実施した。その結果、クルクミン、ゼルンボン、ゲニステイン、カルコンなど複数種の食品成分由来化合物に強い細胞増殖抑制活性が認められた。したがってこれらの化合物はマクロファージ抑制活性があると考えられたが、L929 に対してもTHP-1 やマウス骨髄由来マクロファージと同等の抑制活性を示したため (図1) これらの化合物をマクロファージ抑制に利用するためには、マクロファージに選択的に搬送するための工夫が必要であると考えられた。クルクミンはウコン由来の黄色色素としてよく知られている物質であるが、本試験で最も強い抑制活性を示したので、以降の検討に使用した。

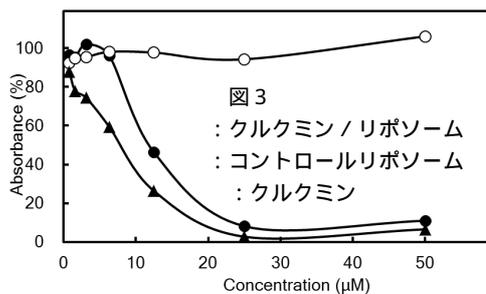


(2) 脂質二重層膜からなるリポソームは生体内に投与した場合に、網内系つまりマクロファージによって優先的に取り込まれることが知られている。そこでマクロファージに強い抑制作用を示したクルクミンについて、マクロファージへの選択的な取り込みを実

現するためにリポソーム化を試みた。脂質 (DPPC、DDPPS、コレステロールのモル比、5:1:4) によるリポソーム化を複数種の方法を使って検討を進めた結果、クルクミンを BSA に吸着させて、improved cholate dialysis 法によりリポソーム化した場合、比較的高含量 (クルクミン/脂質の重量比が 0.51) のリポソーム粒子を作製できることがわかった。得られたクルクミン/リポソームの性状解析により、以下の点が明らかになった。粒子サイズの中心は 60-100nm の範囲に分布していた (図 2)。またクルクミン/リポソームのゼータポテンシャルは -30mV であったことから、粒子表面は陰性の電荷を持つことが示唆された。ゲル電気泳動の結果からは、クルクミンと BSA は主にリポソームの外側に結合していることが示唆された。



(3) クルクミン/リポソームは *in vitro* での RAW264.7 (マウスマクロファージ細胞株) の増殖をフリーのクルクミンとほぼ同様の容量反応曲線で抑制した (図 3)。これらの結果は、リポソーム化した後もクルクミンのマクロファージ抑制活性は十分保たれていることがわかった。

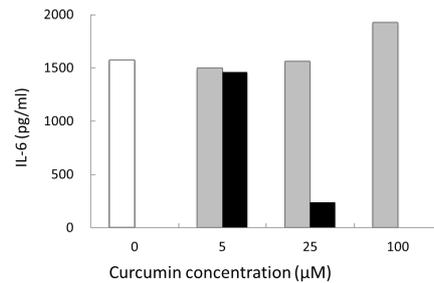


(4) クルクミン/リポソーム (1.8mg/ml, 200 $\mu$ l) を Balb/c マウス腹腔内に 48h と 24h 前に 2 回投与し、その後で、腹腔細胞を回収して、細胞の表面抗原を flow cytometry により調べた。クルクミン自体も蛍光を有しているため、それを利用して解析した結果、F4/80、CD36、CD11b 陽性、Thy1 陰性のマクロファージが主にクルクミン/リポソームを取り込んでいることを確認することができた。

(5) クルクミン/リポソームがマクロファージ機能に影響を与えるかどうかについて、*in vitro* および *in vivo* で IL-6 の産生を指標に検討を行った。チオグリコレート投与により誘導したマウス腹腔細胞を *in vitro* で 24h 培養し、LPS 存在下で、クルクミン/リポソーム添加による IL-6 産生への影響を調べた。その結果、図 4 に示すように、クルク

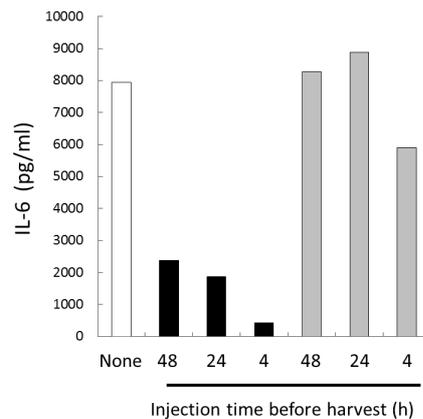
ミン/リポソームの添加により IL-6 産生は顕著に抑制された。

図 4 : 添加なし、■: コントロールリポソーム、□: クルクミン/リポソーム



次にチオグリコレートを投与したマウスにクルクミン/リポソーム (2.9mg/ml, 200 $\mu$ l) を腹腔細胞回収の前 48h, 24h, 4h に *i.p.* 投与し、得られた腹腔細胞を培養して、LPS 刺激による IL-6 産生を調べた。その結果、図 5 に示すように、クルクミン/リポソームの *i.p.* 投与により、腹腔細胞からの IL-6 産生は顕著に抑制されることがわかった。またクルクミン/リポソーム投与マウスでは顕著な体重抑制や生存への影響は認められなかった。

図 5 : 投与なし、■: コントロールリポソーム *i.p.* 投与、□: クルクミン/リポソーム *i.p.* 投与



以上の結果より、本研究を通じて、食品成分のクルクミンを利用して、マウス *in vivo* でマクロファージを選択的に抑制するための新しい方法を開発することができた。

#### 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 2 件)

Chie Amano, Hideki Minematsu, Kazuyo Fujita, Shinki Iwashita, Masaki Adachi, Koichi Igarashi, Shuji Hinuma. Nanoparticles Containing Curcumin Useful for Suppressing Macrophages *In Vivo* in

Mice. PLOS ONE 査読有、(2015) Published: September 11, DOI:0.1371/journal.pone.0137207

Matsuda-Nagasumi K, Takami-Esaki R, Iwachidow K, Yasuhara Y, Tanaka H, Ogi K, Nakata M, Yano T, Hinuma S, Taketomi S, Odaka H, Kaisho Y. Lack of GPR40/FFAR1 does not induce diabetes even under insulin resistance condition. Diabetes Obes Metab. 査読有、(2013) 15:538-45. doi: 10.1111/dom.12065. Epub 2013 Feb 6.

〔学会発表〕(計3件)

峯松秀希、岩下真輝、北川寛之、天野千絵、平松由衣、大谷敬亨、平井政彦、大家一典、日沼州司、五十嵐貢一、高濃度クロドロネート内包リポソームのマウス大腿骨由来骨髄性マクロファージにおける増殖抑制効果、平成23年度、分子生物学会、平成23年12月16日(横浜)

天野千絵、岩下真輝、峯松秀希、北川寛之、平松由衣、大谷敬亨、平井政彦、安達昌城、日沼州司、クルクミン内包リポソームのマクロファージ枯渇効果に関する研究、平成25年度、日本DDS学会学術集会 平成25年7月5日(京都)

Shuji Hinuma. Suppression of macrophage function by liposome containing curcumin. 1st series of Indian Scientists Association in Japan-Lectures. 2014 February 15 (Tsukuba)

〔図書〕(計1件)

Shuji Hinuma, Norio Iijima, Prolactin-releasing peptide. In Second edition of the Handbook of Biologically Active Peptides, Academic press (February 15, 2013).

〔産業財産権〕

出願状況(計2件)

名称：マクロファージ機能抑制及び/又は癌細胞増殖抑制

発明者：日沼州司

権利者：片山化学工業株式会社

種類：特許

番号：特願：2012-169173

出願年月日：平成24年7月31日

国内外の別：国内

名称：バイオイメージング用蛍光標識剤

発明者：日沼州司、曾我公平

権利者：片山化学工業株式会社、東京理科大

種類：特許

番号：特願2013-112295

取得年月日：平成25年5月28日

国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表

日沼州司 (Shuji Hinuma)

千里金蘭大学・生活科学部・

食物栄養学科・教授

研究者番号：60550522

(2) 研究分担者

長田久美子 (Kumiko Nagata)

千里金蘭大学・生活科学部・

食物栄養学科・教授

研究者番号：90068502