

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 6月 5日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011 ~ 2012

課題番号：23790292

研究課題名（和文）

フラボノイドの細胞保護作用を決定する細胞膜の機能的・構造的変化の解析

研究課題名（英文）

The analysis of functional and structural changes of the cell membrane induced by flavonoids to exhibit cytoprotective effects

研究代表者

松島 充代子 (MATSUSHIMA MIYOKO)

名古屋大学・医学系研究科（保健）・助教

研究者番号：10509665

研究成果の概要（和文）：フラボノイドの多彩な細胞保護作用は細胞に共通した分子機構の阻害により発揮されると考えられ、本研究ではフラボノイドによる細胞膜の機能的・構造的変化を解析し、フラボノイドの作用機序を解明する基礎的検討を行った。その結果、ケルセチンが細胞保護作用を発揮するのに必要な heme oxygenase (HO)-1 の誘導において、細胞膜直下で活性化する phospholipase D (PLD) が関与している可能性が考えられた。

研究成果の概要（英文）：The variety of the cytoprotective effects of flavonoids is assumed to inhibit common molecular mechanisms. In this study, I investigated the functional and structural changes of the cell membrane by quercetin, one of the flavonoids, to elucidate the molecular mechanisms of inhibitory effect of flavonoids. I showed the possibilities that quercetin translocated PLD to plasma membrane and induced the expression of HO-1 which is the key molecule to exhibit cytoprotective effects.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：免疫学

科研費の分科・細目：基礎医学、薬理学一般

キーワード：フラボノイド、heme oxygenase-1、細胞膜

1. 研究開始当初の背景

近年、国民の健康への意識が高まり、生活習慣病をはじめとする様々な疾患を自分で予防するセルフメディケーションの動きが活発になっている。その代表的な例として健康食品の活用があり、その市場規模は年々拡大して種類も豊富になっている。特に天然の植物などから取れる機能性成分を用いた健康食品は生体に安全であるとして数多く存在する。しかしながら、一部の健康食品では摂取した結果重篤な疾患を発症し、死に至ったケースも報告されている。このように健康食品における「食の安全」を確保するため、現在入手可能な健康食品について作用機序や安全性を再評価することは非常に重要で

ある。

フラボノイドは主に野菜や果物に存在する天然の機能性成分で一部はすでに健康食品として商品化されている。フラボノイドの作用は多岐にわたり、抗アレルギー作用、抗炎症作用、抗酸化作用などがある。私はフラボノイドの抗アレルギー作用を検討し、フラボノイドの新しい作用機序として heme oxygenase (HO)-1 の活性化および発現誘導による機序を明らかにした (Matsushima et al., *Inflammation Res.* 58: 705, 2009, Matsushima et al., *Inflammation.* 32: 99, 2009)。また、現在肺胞上皮細胞ならびに線維芽細胞においてフラボノイドの一種であるケルセチンが HO-1 を誘導し、活性酸素による肺胞上皮の傷害を

抑えたり、サイトカイン誘導性の膠原線維増生を抑制することも予備実験で確認している。このようにフラボノイドは多種類の細胞に対して様々な保護作用を示す。私はフラボノイドの多彩な細胞保護作用の発揮には共通した作用機序があると想定し、細胞が外界と接する最初の場所であり各種シグナル伝達分子を集積し活性化を促す細胞膜、特に脂質ラフト、カベオラに注目した。細胞膜の中にはある特定の脂質からなるマイクロドメインが形成されており、その中にはコレステロールやスフィンゴ脂質に富んだ脂質ラフトと呼ばれる部分と脂質ラフトに caveolin が挿入されることで形成されるカベオラがある。脂質ラフトやカベオラでは src キナーゼや G タンパク質、G タンパク質共役型受容体 (GPCR) などシグナル伝達に関わる分子が集積しシグナル伝達を制御すると考えられている。実際に予備実験でフラボノイドの一種であるケルセチンが肥満細胞の活性化を促すシグナル伝達分子 Lyn の脂質ラフトへの集積を抑制することを確認しており、フラボノイドが細胞膜に何らかの変化を起こすことが考えられる。

2. 研究の目的

フラボノイドは天然に存在する機能性成分で抗アレルギー作用、抗炎症作用、抗酸化作用など様々な作用を有しているが、分子レベルでの詳細な作用機序については明らかにされていない。本研究ではフラボノイドの多彩な細胞保護作用の発揮には細胞に共通した分子機構の阻害により発揮されると考え、フラボノイドによる細胞膜の機能的・構造的変化を解析し、フラボノイドの作用機序を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

ケルセチンの細胞保護作用のうち、抗アレルギー作用、活性酸素による細胞傷害、toll-like receptor (TLR) を介したマクロファージの活性化に対するケルセチンの保護作用に焦点をあて、フラボノイドによる細胞膜の変化を①脂質ラフト構成成分の変化、②細胞膜に局在するシグナル伝達分子の活性化、③カルシウム流入を促進する小胞体介在分子と細胞膜に局在する分子の融合の3つに分け、それぞれに対するケルセチンの影響および HO-1 との関与を評価した。

過去に HO-1 を介して肥満細胞の活性化を抑制することを報告しているケルセチンをフラボノイドとして用いた (Matsushima et al., *Inflammation Res.* 58: 705, 2009, Matsushima et al., *Inflammation.* 32: 99, 2009)。細胞はラット肥満細胞株 RBL-2H3 細胞、マウス肺胞上皮細胞株 LA-4 細胞、マウスマクロファージ細胞株 RAW264.7 細胞を用いた。肥満細胞株の

場合は A23187 あるいは IgE 刺激による脱顆粒および各種サイトカインの発現増強について、肺胞上皮細胞株の場合は過酸化水素曝露による細胞の傷害について、マクロファージ細胞株の場合には TLR4 を介した各種サイトカインの発現増強について、それぞれの作用に対するケルセチンの抑制効果を検討した。また、それぞれの系で実際に HO-1 の作用が細胞保護作用にどの程度関与しているか HO-1 の阻害剤を用いて検討した。さらにケルセチンが細胞膜に局在する分子の動態に及ぼす影響を検討するため、caveolin-1、PLD、stromal interaction molecule (STIM) 1 についてウエスタンブロット法を中心に検討した。

4. 研究成果

1. ケルセチンによる細胞保護作用および HO-1 の関与

はじめにケルセチンの多彩な細胞保護作用を確認するため、LA-4 細胞および RAW264.7 細胞を用いてそれぞれ活性酸素による細胞傷害および TLR を介したマクロファージの活性化に対するケルセチンの効果について検討した。なお、肥満細胞におけるケルセチンの HO-1 を介した抗アレルギー作用は過去に報告している。

① 活性酸素による細胞傷害に対するケルセチンの効果

LA-4 細胞についてケルセチンは転写因子 Nrf2 の活性化を介して HO-1 の発現を誘導することを確認した (Fig. 1)。また、ケルセチ

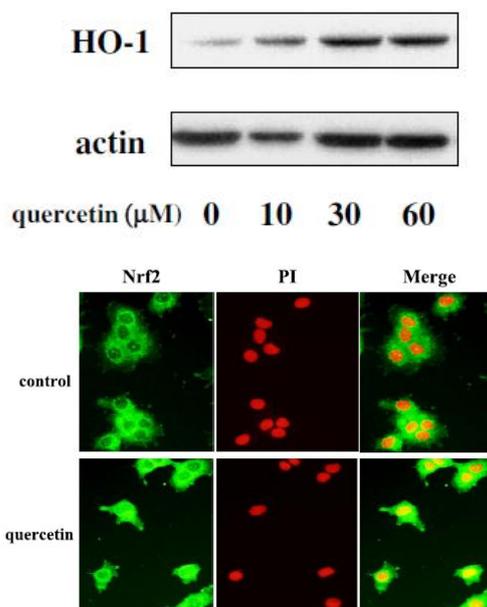


Fig. 1 LA-4細胞におけるケルセチンのHO-1の発現誘導およびNrf2の核内移行

ンはLA-4細胞が過酸化水素曝露により受ける傷害を抑制した。さらに、ケルセチンはHO-1の発現増強を介してこれらの抑制効果を示すことが明らかとなった (Fig. 2)。以上の研究結果については Biochem. Biophys. Res. Commun. の2012年1月号(417巻:169-74)に報告した。

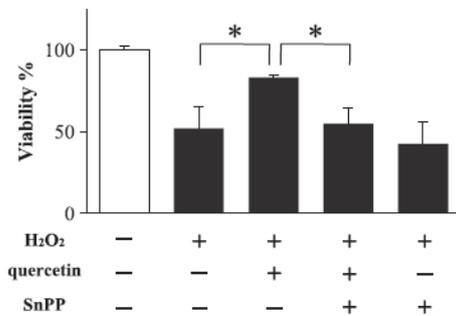


Fig. 2 H₂O₂刺激による細胞傷害に対するケルセチンの効果およびHO-1の関与

②TLR を介したマクロファージの活性化に対するケルセチンの効果

RAW264.7細胞においてケルセチンは濃度依存的にHO-1の発現を増強することを確認した(Fig. 3)。また、LPS/IFN- γ 刺激により活性化したマクロファージにおけるケルセチンの効果を検討した。培養上清中のnitrite (NO₂)濃度を測定し、NO産生量を評価した。ケルセチンはRAW264.7細胞においてNOの産生を抑制し、またHO-1阻害剤であるSnPP

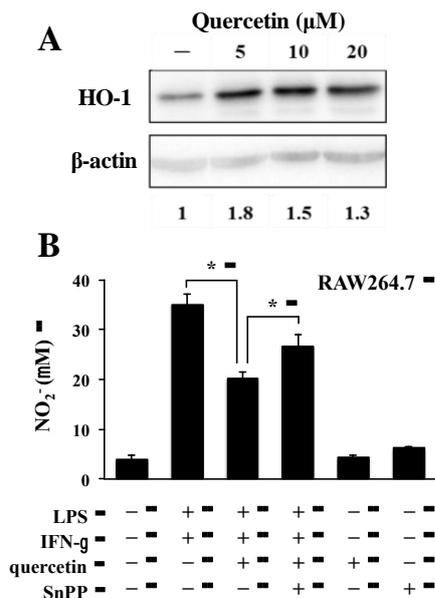


Fig. 3 RAW264.7細胞におけるケルセチンのHO-1の発現誘導(A)およびLPS/IFN γ 刺激によるNO産生に対するケルセチンの効果(B)

によりケルセチンの抑制効果は解除された (Fig. 3)。以上の結果からケルセチンはマクロファージにおいてHO-1を活性化させることによりNOの産生を抑制していることが明らかとなった。

2. ケルセチンによるHO-1の発現誘導に対する細胞膜局在分子の関与

これまでの結果でケルセチンはさまざまな刺激、細胞種においてHO-1を介して抑制効果を示すことが明らかとなった。次に細胞膜に局在する分子で、HO-1と相互作用をする可能性が報告されているcaveolin-1およびPLDについて阻害剤を用いて検討した。

①caveolin-1

予備実験において、RBL-2H3細胞でケルセチン曝露によりcaveolin-1 mRNAの発現が低下することを確認していたが、タンパクレベルで確認したところ発現に大きな変化は見られなかった。これはLA-4細胞でも同様の結果が得られ、またRAW264.7細胞では定常状態においてcaveolin-1の発現は確認できなかった。

②PLD

ケルセチンによるHO-1の発現誘導においてPLDの関与を検討するため、PLDの阻害剤である1-butanolを用いて検討した。RBL-2H3細胞、RAW264.7細胞 (Fig. 4)、LA-4細胞 (Fig. 5A)において1-butanol処理によりケルセチンによるHO-1の発現増強が定常状態まで戻ったことから、ケルセチンによる

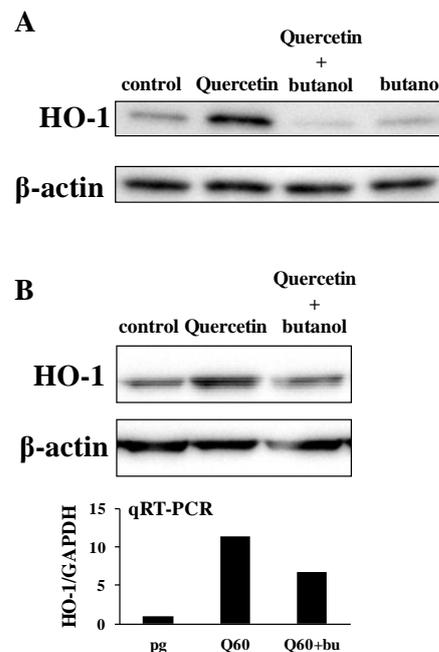


Fig. 4 ケルセチンによるHO-1の発現誘導におけるPLDの関与 A) RBL-2H3細胞、B) RAW264.7細胞

HO-1 の発現誘導には PLD が関与していることが示唆された。また、LA-4 細胞において PLD1 の細胞内動態を蛍光免疫染色により評価した。ケルセチン曝露によって PLD1 は細胞質内へと移行することが明らかとなり、PLD1 が細胞膜へと移行することで HO-1 の発現を誘導する可能性が示唆された (Fig. 5B)。

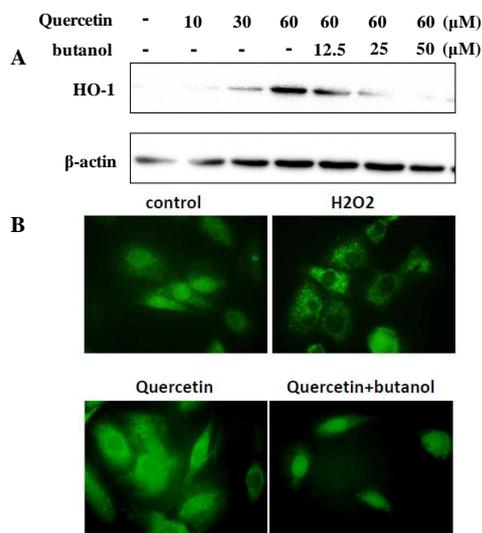


Fig. 5 LA-4細胞におけるケルセチンによるHO-1発現誘導に及ぼすPLDの関与
A) ケルセチンによるHO-1の発現誘導に対するPLDの関与
B) ケルセチン曝露によるPLDの細胞内動態

3. ケルセチンによる肥満細胞活性化の抑制における STIM1 の役割

肥満細胞の脱顆粒には細胞内へのカルシウムの流入が必須であり、小胞体からのカルシウム放出を感知する stromal interaction molecule (STIM) 1 が細胞膜上のカルシウムチャネルへ移行することでカルシウムの流入が起こるとされている。そこで、ケルセチンの脱顆粒抑制機序について、STIM 1 の細胞膜への移行に対する作用を、免疫蛍光染色法を用いて検討した。現在まだ検討中ではあるが、RBL-2H3 細胞において thapsigargin 刺激による STIM1 の活性化をケルセチンは抑制する可能性が考えられた。

以上の結果より、ケルセチンの多彩な細胞保護作用は HO-1 の発現増強を基盤として発揮され、HO-1 の誘導機序には PLD が関与する可能性が示唆された。また、肥満細胞の活性化においてはケルセチンは活性化時に細胞膜へと移行する STIM1 の機能を抑制する可能性が示唆された。これらの詳細な分子メカニズムについては今後も検討を進めていく。

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 5 件)

- Ishida S, Nishizawa N, Kitatsuji M, Ohshima H, Hasegawa Y, Matsushima M, Kawabe T. Observation of Fine Lung Structure by Ultrahigh-Resolution Optical Coherence Tomography Using 800, 1060, and 1300nm Supercontinua. *Jpn. J. Appl. Phys.* 51: 047001, 2012 査読有 DOI: 10.1143/JJAP.51.047001
- Hayashi Y, Matsushima M, Nakamura T, Shibasaki M, Hashimoto N, Imaizumi K, Shimokata K, Hasegawa Y, Kawabe T. Quercetin protects against pulmonary oxidant stress via heme oxygenase-1 induction in lung epithelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 417(1):169-74, 2012 査読有 DOI: 10.1016/j.bbrc.2011.11.078
- 片山 真、杉田智哉、加藤竜司、大河内美奈、松島充代子、川部 勤、高瀬智和、吉田安子、川瀬三雄、本多裕之。ミルクタンパク質全網羅ペプチドアレイを用いた IgG 結合ペプチドの探索。 *化学工学論文集*, 37 (6): 546-550, 2011 査読有 DOI: 10.1252/kakoronbunshu.37.546
- Kawabe T, Matsushima M, Hashimoto N, Imaizumi K, Hasegawa Y. CD40/CD40 ligand interactions in immune responses and pulmonary immunity. *Nagoya J Med Sci*, 73 (3-4): 69-78, 2011 査読有 http://www.med.nagoya-u.ac.jp/medlib/nagoya_j_med_sci/7334/v73n34p69_78.pdf
- Nakamura T, Matsushima M, Hayashi Y, Shibasaki M, Imaizumi K, Hashimoto N, Shimokata K, Hasegawa Y, Kawabe T. Attenuation of TGF-β-Stimulated Collagen Production in Fibroblasts by Quercetin-Induced HO-1. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 44(5):614-620. 2011 査読有 DOI : 10.1165/rcmb.2010-0338OC

[学会発表] (計 2 5 件)

- Shikano T., Shikida M., Matsushima M., Kawabe T., and Sato K. MEASUREMENT OF BREATHING CHARACTERISTIC IN MOUSE DURING INHALING DRUG. *25th International Conference on Micro Electro Mechanical Systems*, Marriott Paris Rive Gauche Hotel (Paris, France), 2012.2.2
- Nishizawa N., Ishida S., Kitatsuji M., Ohshima H., Hasegawa Y., Matsushima M., and Kawabe T. Ultrahigh resolution optical coherence tomography imaging of diseased

- rat lung using Gaussian shaped super continuum sources. *BIOS*, The Moscone Center (San Francisco, California, USA), 20 January 2012
3. Kawabe T, Nakamura T, **Matsushima M**, Hayashi Y, Shibasaki M, Imaizumi K, Hashimoto N, Shimokata K, Hasegawa Y. Heme oxygenase-1 induced by quercetin attenuates TGF- β -stimulated collagen production in fibroblasts. *ERS Amsterdam 2011 Congress*, RAI Amsterdam (Amsterdam, Netherlands), September 26th 2011
 4. **Matsushima M**, Shikida M, Yamamoto Y, Yamamoto Y, Iwai S, Shikano T, Kawabe T. Development of thermal flow microsensors for transbronchial measurement of local lung function. *21st Congress of Interasthma Japan North Asia*, Gifu, Japan, July 1st 2011. 岐阜都ホテル (岐阜県)
 5. Nishizawa N., Ishida S., Ohta T. Itoh K., Kitatsuji M., Ohshima H., Hasegawa Y., **Matsushima M**, and Kawabe T. Ultrahigh resolution optical coherence tomography imaging of lung structure using Gaussian shaped super continuum sources. *BIOS*, USA, January 2011
 6. Nishizawa N., Ishida S., Ohta T. Itoh K., Kitatsuji M., Ohshima H., Hasegawa Y., **Matsushima M**, and Kawabe T. *Ex-vivo* ultra-high-resolution optical coherence tomography imaging of fine lung structure by use of a high-power Gaussian-like supercontinuum at 0.8- μ m wavelength. *BIOS*, USA, January 2011
 7. Yamaguchi T, **Matsushima M**, Nose H, Kawabe T. Analysis of IgE-binding epitope variation in the allergen after repeated immunization. *第41回日本免疫学会*, 2012.12.6 神戸コンベンションセンター (兵庫県)
 8. Nose H, **Matsushima M**, Yamaguchi T, Kawabe T. Attenuation of Transforming Growth Factor- β -Stimulated Collagen Production in Fibroblasts by Chrysin. *第41回日本免疫学会*, 2012.12.5 神戸コンベンションセンター (兵庫県)
 9. **Matsushima M**, Nose H, Yamaguchi T, Kawabe T. The Effect of Quercetin on the Activation of Alveolar Macrophages. *第41回日本免疫学会*, 2012.12.5 神戸コンベンションセンター (兵庫県)
 10. 山口剛広, **松島充代子**, 川部 勤. 頻回な抗原の曝露によるIgE認識エピトープの解析. *第62回日本アレルギー学会秋季学術大会* 2012.12.1 大阪国際会議場 (大阪府)
 11. 野瀬遥加, **松島充代子**, 太田川茅沙, 川部 勤. 線維化に及ぼすクリシンの効果の検討. *第62回日本アレルギー学会秋季学術大会* 2012.12.1 大阪国際会議場 (大阪府)
 12. **松島充代子**, 式田光宏, 山本ゆき, 吉川和宏, 鹿野嵩瑛, 川部 勤. 微細気流計を用いた喘息モデルマウスの気流変化の観察. *第62回日本アレルギー学会秋季学術大会* 2012.11.29 大阪国際会議場 (大阪府)
 13. 西澤典彦, 石田周太郎, 北辻真史, 大島啓嘉, **松島充代子**, 川部勤. 超高分解能OCTによる肺組織の3次元高解像度断層イメージング. *日本光学会年次大会 Optics & Photonics Japan 2012* 2012.10.24 タワーホール船堀 (東京都)
 14. 野瀬遥加, **松島充代子**, 太田川茅沙, 川部 勤. 膠原線維産生に及ぼすクリシンの効果についての検討. *第7回日本臨床検査教育協議会* 2012.8.24 名古屋国際会議場 (愛知県)
 15. 山口剛広, **松島充代子**, 川部 勤. IgE結合部位からみたアレルゲンの抗原性の変化. *第7回日本臨床検査教育協議会* 2012.8.23 名古屋国際会議場 (愛知県)
 16. 高嶋浩司, **松島充代子**, 西澤典彦, 北辻真史, 大島博嘉, 長谷川好規, 川部 勤. 超高分解能OCTを用いた正常ならびに疾患肺の組織学的検討. *第52回日本呼吸器学会学術講演会* 2012.4.21 神戸コンベンションセンター (兵庫県)
 17. Nakamura T, **Matsushima M**, Hayashi Y, Shibasaki M, Imaizumi K, Hashimoto N, Hasegawa Y, Kawabe T. TGF- β -stimulated collagen production in fibroblasts is attenuated by quercetin-induced heme oxygenase-1. *第52回日本呼吸器学会学術講演会* 2012.4.20 神戸コンベンションセンター (兵庫県)
 18. **松島充代子**, 寺西彩香, 小笠原名奈子, 山本祐規子, 高木 健三, 川部 勤. 肥満細胞活性化におけるクリシンの効果. *第132回日本薬学会* 2012.3.29 北海道大学 (北海道)
 19. 寺西彩香, **松島充代子**, 川部 勤. Analysis on the inhibitory effect of chrysin in mast cell degranulation. *第40回日本免疫学会*, 2011.11.29 幕張メッセ (千葉県)
 20. **松島充代子**, 中村俊信, 今泉和良, 長谷川好規, 川部 勤. ケルセチンの抗線維化作用とHO-1の関与. *第61回日本アレルギー学会秋季学術大会*, 2011.11.12 グランドプリンスホテル新高輪 国際館パミール (東京都)
 21. 寺西彩香, **松島充代子**, 山本祐規子, 高

- 木健三、川部 勤. クリシンの脱顆粒抑制機序の検討. **第 61 回日本アレルギー学会秋季学術大会**, 2011.11.11 グランドプリンスホテル新高輪 国際館パミール (東京都)
22. 山本祐規子、**松島充代子**、寺西彩香、高木健三、川部 勤. 抗原に対する抗体の高親和性獲得における CD40 の役割, **第 61 回日本アレルギー学会秋季学術大会**, 2011.11.10 グランドプリンスホテル新高輪 国際館パミール (東京都)
23. 西澤典彦、石田周太郎、北辻真史、大島啓嘉、**松島充代子**、川部勤. 超高分解能 OCT による肺組織の高解像度観察 **Ultrahigh resolution OCT imaging of lung tissues. 日本光学会年次学術講演会 Optics & Photonics Japan 2011**, 2011. 11.30 大阪大学・吹田キャンパス (大阪府)
24. 寺西彩香、**松島充代子**、森 朱美、山本祐規子、高木健三、川部 勤. 脱顆粒抑制能をもつクリシンの作用機序の検討. **第 42 回日本職業・環境アレルギー学会総会・学術大会**, 2011.6.3 名古屋国際会議場 (愛知県)
25. **松島充代子**、長谷川好規、川部 勤. 肺組織観察用超高分解能 OCT の開発. **第 23 回日本アレルギー学会春季臨床大会**, 2011. 5. 15 幕張メッセ (千葉県)

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 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 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

研究室 HP

<http://square.umin.ac.jp/kawabe/index.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

松島充代子 (MATSUSHIMA MIYOKO)
名古屋大学・医学系研究科 (保健)・助教
研究者番号 : 10509665

(2)研究分担者なし

(3)連携研究者なし