

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 21 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24700819

研究課題名(和文) 抗酸化物質の作用特性および体内動態特性に基づく痛風予防法の確立

研究課題名(英文) Strategy for gout prevention based on pharmacodynamics and pharmacokinetics of antioxidants

研究代表者

小倉 次郎 (Ogura, Jiro)

北海道大学・薬学研究科(研究院)・助教

研究者番号：20580640

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円、(間接経費) 1,020,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、尿酸排泄トランスポーターBCRPを標的とした痛風予防法の確立を目指し、18種の抗酸化物質について、主要な活性酸素産生系に対する作用を検討した。キサンチンオキシダーゼおよびNADPHオキシダーゼ由来の活性酸素はBCRPの輸送活性に重要なS-S bond形成を抑制する。これら活性酸素産生酵素に対し、強い抗酸化作用を示すものとしてカフェイン酸が見出された。さらに、カフェイン酸のBCRP S-S bond形成に対する効果は消化管細胞内濃度が重要であることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is development of gout prevention targeting BCRP, which is a urate efflux transporter. We found that caffeic acid is effective in scavenging reactive oxygen species (ROS) derived from xanthine oxidase and NADPH oxidase. ROS derived from these oxidases can suppress BCRP S-S bond formation. Moreover, we found that accumulation of caffeic acid in intestinal epithelial cells was important for ROS scavenging activity of caffeic acid.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：生活科学・食生活学

キーワード：痛風 BCRP 抗酸化物質 薬力学的特性 薬物動態学的特性

1. 研究開始当初の背景

近年、医療の目覚ましい発展により平均寿命が大幅に延長し、世界的に高齢化社会を迎えている。高齢化社会の進展に伴い、生活習慣病をはじめとする加齢性疾患患者が増加し、加齢に伴う Quality of life (QOL) の低下が問題となっている。代表的な生活習慣病である痛風は、激しい関節痛を生じ、さらには高血圧や腎臓病などの発症リスクを高める。このため、患者の QOL 低下が著しく、効果的な予防法の確立が強く望まれる疾患のひとつである。2009 年、痛風の原因遺伝子として BCRP (*ABCG2*) が同定された [Matsuo et al. *Sci. Transl. Med.* (2009), Woodward et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* (2009)]。しかしながら、痛風に対する効果的な予防法の確立には至っていない。

痛風の発症頻度は加齢により増大することから [Mikuls et al. *Ann. Rheum. Dis.* (2005)]、加齢による酸化ストレスとの関連が考えられる。生体内の代表的な活性酸素産生系としてキサンチンオキシダーゼ (XO)、NADPH oxidase (Nox)、ミトコンドリア電子伝達系 (Mit) の 3 つが知られている。BCRP は Cys603 に S-S bond を形成し、ホモダイマーとして機能しており、BCRP の S-S bond 形成すなわちホモダイマー形成は XO 由来の活性酸素により抑制される一方、Mit 由来の活性酸素により促進される [Ogura et al., *J. Pharm. Pharm. Sci.* (2012)]。このことから、痛風を効果的に予防するためには活性酸素産生系に対する特異性を有する抗酸化物質を用いる必要があると考えた。

2. 研究の目的

本研究では抗酸化物質の各活性酸素産生系に対する作用特性を解析することで、多種の抗酸化物質から痛風予防に最適な抗酸化物質を探索し、確固たる痛風予防法の構築を目指す。

3. 研究の方法

抗酸化物質の XO、Nox、Mit 由来活性酸素に対する作用を評価すべく、XO 由来活性酸素はヒポキサンチンを基質とした MPEC 化学発光法により、Nox 由来活性酸素はラット心臓の膜画分を用いた NADPH を基質とするルシゲニン化学発光法により、Mit 由来活性酸素はラット肝臓から単離したミトコンドリアを用いたコハク酸、NADH (呼吸基質) を基質とするルシゲニン化学発光法により評価することとした。なお、Mit 由来活性酸素の評価に用いた単離ミトコンドリアは respiratory control index (RCI) が 4 以上の高い活性を示したものをを用いた。

痛風の原因となる尿酸は約 70%が腎臓から、30%が消化管から排泄され、BCRP は尿酸の消化管排泄への寄与が大きい [Ichida et al., *Nat. Commun.* (2012)]。そこで、*in vitro* の検討ではヒト消化管モデル細胞株として汎

用される Caco-2 細胞を用いた。

4. 研究成果

初めに、各評価系の妥当性を確認する目的で、各活性酸素産生系に対する特異的阻害剤を用いて検討した。XO 由来活性酸素の評価系において、XO 阻害剤であるアロプリノールは濃度依存的に MPEC の発光を抑制した (図 1A)。一方、Nox 阻害剤であるアポシニン は 10 mM まで、Mit 阻害剤であるロテノン は 100 μM までの濃度範囲において有意な MPEC 発光の抑制作用を示さなかった (データは示さない)。続いて、Nox 由来活性酸素の評価系について、同様に検討した。その結果、Nox 阻害剤であるアポシニンは濃度依存的にルシゲニンの発光を抑制した (図 1B)。一方、XO 阻害剤であるアロプリノールは 1 mM まで、Mit 阻害剤

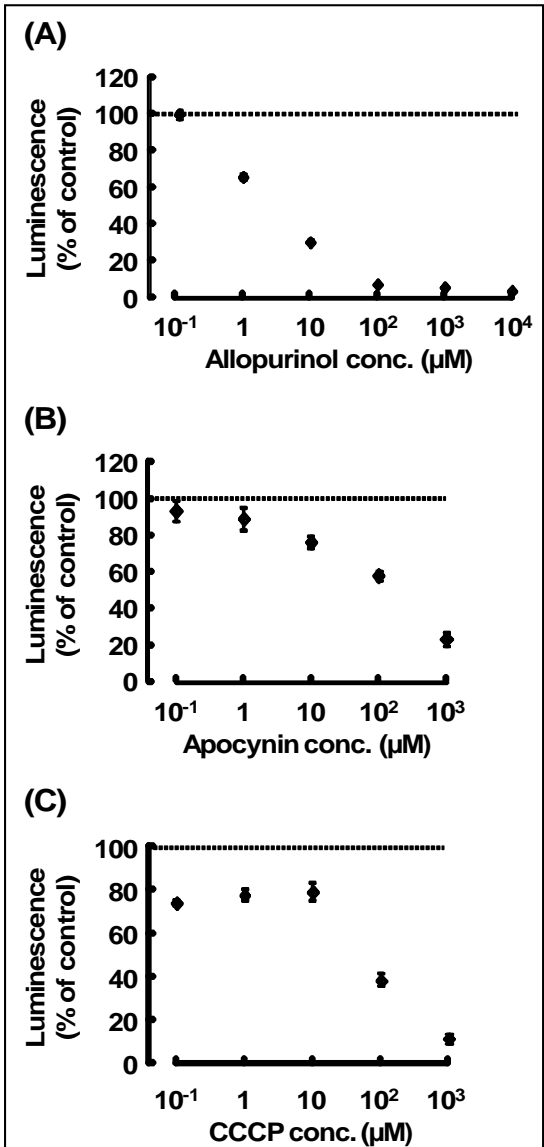


図 1 XO (A)、Nox (B)、Mit (C) 由来活性酸素に対する各阻害剤の作用

(A) XO 由来活性酸素に対するアロプリノールの作用

(B) Nox 由来活性酸素に対するアポシニンの作用

(C) Mit 由来活性酸素に対する CCCP の作用

であるロテノン<sup>1</sup>は 100  $\mu\text{M}$  までの濃度範囲において有意なルシゲニン発光の抑制作用を示さなかった(データは示さない)。最後に、Mit 由来活性酸素の評価系について検討した。Mit 阻害剤であるロテノンは濃度依存的にルシゲニンの発光を抑制したものの、その抑制効果は小さかった(データは示さない)。そこで、脱共役型の Mit 阻害剤 CCCP (図 1C)、FCCP (データは示さない) を用いて検討したところ、ともに濃度依存的にルシゲニンの発光を抑制した。一方、XO 阻害剤であるアロプリノール、Nox 阻害剤であるアポシニンは 1 mM までの濃度範囲において有意なルシゲニン発光の抑制作用を示さなかった(データは示さない)。以上のことから、各評価系により各活性酸素産生系に対する作用を特異的に評価できることが示された。

続いて、18 種の抗酸化物質の各産生系由来活性酸素に対する抗酸化作用を解析した。初めに、XO 由来活性酸素に対する作用を評価した(一部、過去の検討を引用している)。その結果、アピゲニン、ルテオリン、ケルセチン、エピガロカテキンガレートが特に強い抗酸化作用を示し、アスコルビン酸、 $\beta$ カロテン、ルテイン、クロロゲン酸、カフェイン酸、クルクミンも比較的強い抗酸化作用を示した(表 1)。また、Nox 由来活性酸素に対してはカフェイン酸、ルテオリン、ケルセチン、エピガロカテキンガレートが特に強い抗酸

表 1 様々な抗酸化物質の XO 由来活性酸素に対する IC<sub>50</sub>

Com pounds	IC <sub>50</sub> ( $\mu\text{M}$ )	Ref.
Ascorbic acid	22.5 $\pm$ 1.19	1
a-Tocopherol	>10000	2
b-Carotene	89.1 $\pm$ 13.5	1
Lutein	36.3 $\pm$ 2.75	4
Chlorogenic acid	41.0 $\pm$ 1.21	5
Caffeic acid	10.1 $\pm$ 9.32	5
p-Coumaric acid	3620 $\pm$ 140	*
Ferulic acid	6610 $\pm$ 499	1
Curcumin	37.7 $\pm$ 14.7	
Apigenin	4.52 $\pm$ 1.01	*
Luteolin	4.57 $\pm$ 0.28	*
Genistein	748 $\pm$ 287	6
Quercetin	1.52 $\pm$ 0.09	*
Naringenin	3760 $\pm$ 1040	*
(-)-Epigallocatechin gallate	5.34 $\pm$ 0.682	1
CoQ10	95.8 $\pm$ 43.5	*
a-Lipoic acid	479 $\pm$ 43.0	1
Carnitine	>10000	*

- (1) Itagaki S. et al. Food Chem. 2009.
  - (2) Takano R. et al. Jpn. J. Pharm. Health Care Sci. 2009.
  - (3) Itagaki S. et al. Food chem. 2010.
  - (4) Sato Y. et al. Food Chem. 2011.
  - (5) Sato Y. et al. Int. J. Pharm. 2011.
  - (6) Sato Y. et al. Biol. Pharm. Bull. 2011.
- (\*) Previous data (unpublished).

化作用を示し、アスコルビン酸、クルクミンも比較的強い抗酸化作用を示した(表 2)。さらに、Mit 由来活性酸素に対してはルテイン、クルクミン、エピガロカテキンガレートが特に強い抗酸化作用を示し、ルテオリン、ケルセチンも比較的強い抗酸化作用を示した(表 3)。また、別の検討において Nox 由来活性酸素は XO 由来活性酸素と同様に BCRP S-S bond 形成を抑制することが明らかとなった。このことから、XO および Nox 由来活性酸素に対し強い抗酸化作用を示し、Mit 由来活性酸素に対しては作用を示さない抗酸化物質が痛風予防に最適と考えられ、アスコルビン酸、カフェイン酸が有用であると示唆された。特にカフェイン酸はアスコルビン酸と比較して XO 由来活性酸素に対し 2 倍、Nox 由来活性

表 2 様々な抗酸化物質の Nox 由来活性酸素に対する IC<sub>50</sub>

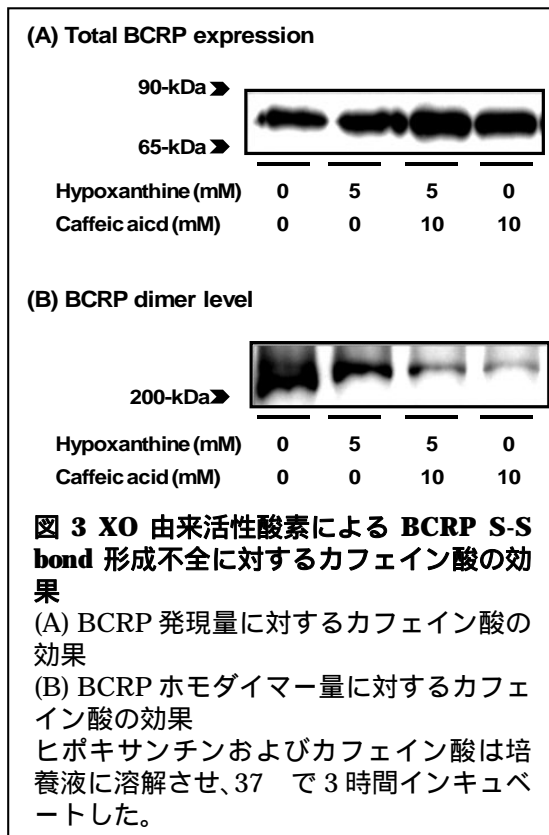
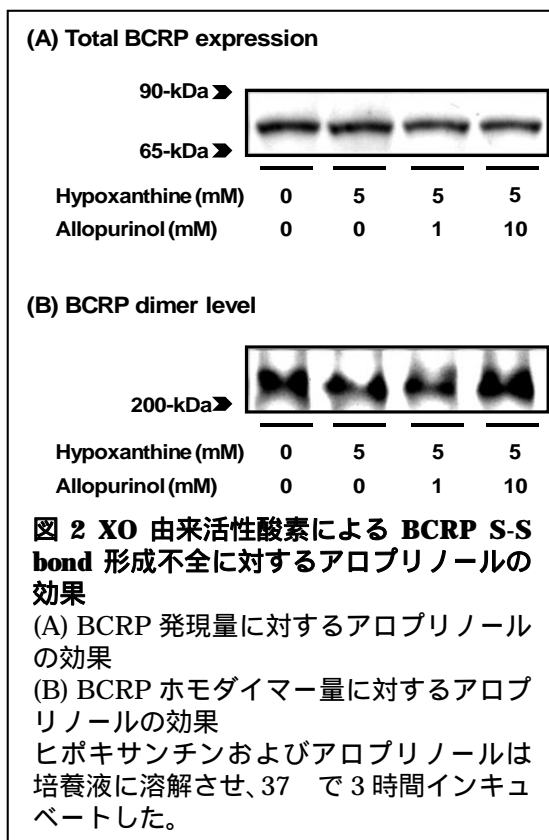
Com pounds	IC <sub>50</sub> ( $\mu\text{M}$ )
Ascorbic acid	31.35 $\pm$ 9.37
a-Tocopherol	754.08 $\pm$ 205.56
b-Carotene	368.40 $\pm$ 189.36
Lutein	645.57 $\pm$ 315.90
Chlorogenic acid	>1000
Caffeic acid	0.574 $\pm$ 0.428
p-Coumaric acid	>1000
Ferulic acid	620.94 $\pm$ 528.45
Curcumin	70.97 $\pm$ 61.59
Apigenin	103.86 $\pm$ 17.22
Luteolin	0.567 $\pm$ 0.113
Genistein	250.75 $\pm$ 181.92
Quercetin	3.676 $\pm$ 1.88
Naringenin	219.65 $\pm$ 108.2
(-)-Epigallocatechin gallate	0.943 $\pm$ 0.368
CoQ10	>1000
a-Lipoic acid	>1000
Carnitine	369.93 $\pm$ 196.89

表 3 様々な抗酸化物質の Mit 由来活性酸素に対する IC<sub>50</sub>

Com pounds	IC <sub>50</sub> ( $\mu\text{M}$ )
Ascorbic acid	374.9 $\pm$ 231.1
a-Tocopherol	>1000
b-Carotene	561.4 $\pm$ 342.9
Lutein	33.1 $\pm$ 15.5
Chlorogenic acid	796.8 $\pm$ 434.1
Caffeic acid	408.9 $\pm$ 250.5
p-Coumaric acid	997.8 $\pm$ 258.9
Ferulic acid	>1000
Curcumin	17.3 $\pm$ 4.7
Apigenin	>1000
Luteolin	89.0 $\pm$ 57.9
Genistein	>1000
Quercetin	82.1 $\pm$ 64.8
Naringenin	>1000
(-)-Epigallocatechin gallate	21.0 $\pm$ 7.25
CoQ10	>1000
a-Lipoic acid	>1000
Carnitine	>1000

酸素に対し6倍強い抗酸化作用を示した。

最後にヒト消化管モデル細胞株であるCaco-2細胞を用いて、XO由来活性酸素によるBCRP S-S bond形成抑制に対するカフェイン酸の効果を検討した。XO基質であるヒポキサンチンにより酸化ストレスを誘導させたところ、BCRP発現量に変動は見られなかった



が(図2A)、S-S bondを形成したBCRPホモダイマー量が減少した(図2B)。これに対し、XO阻害剤であるアロプリノールを1mMで共存させたところ効果は見られなかったが、10mMの共存によりBCRPのホモダイマー量は回復した(図2B)。一方、10mMのカフェイン酸を共存させても回復効果は見られなかった。また、10mMのカフェイン酸は単独で添加した場合にもBCRPのS-S bond形成を抑制した。以前の検討から、Mit由来活性酸素の減少はBCRPのS-S bond形成を抑制することを明らかとしている [Ogura et al., J. Pharm. Pharm. Sci. (2012)]。また、Caco-2細胞の細胞内容積はおよそ2.5 μL/cm<sup>2</sup>とされており [Aiba et al., Biol. Pharm. Bull. (2005)]、この細胞内容積を用いて、Caco-2細胞内のカフェイン酸濃度を過去の報告 [Sato et al., Int. J. Pharm. (2011)] から見積もったところ、500 μM以上の添加ではMit由来活性酸素に対するカフェイン酸のIC<sub>50</sub> (408.9 μM)以上と推定された。以上のことから、10mMのカフェイン酸添加時にはXOおよびNox由来活性酸素のみならず、Mit由来活性酸素も減少していると推察された。

以上、本研究の結果からXO由来活性酸素によるBCRP S-S bond形成抑制に対する抗酸化物質の効果は薬力学的特性と薬物動態学的特性の両面から検証する必要があると示唆された。

#### 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1件)

Ogura J, et al. (1st/11) Quercetin-3-rhamnoglucoside (rutin) stimulates transport of organic anion compounds mediated by organic anion transporting polypeptide 2B1. *Biopharm. Drug Dispos.* 査読有, 35巻, 2014, pp. 173-182.

<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/bdd.1882/abstract;jsessionid=4F96F1DF2D8DE9E4379239248F291089.f01t03>

[学会発表](計2件)

1. Ogura J, et al. (1st/7) Activation of xanthine oxidase suppresses excretion of uric acid to the intestinal lumen. 17th Biennial Meeting of Society for Free Radical Research International. 2014年3月23-26日. 京都(国立京都国際会館).

2. Ogura J, et al. (1st/8) Activation of xanthine oxidase suppresses disulfide bond formation of breast cancer resistance protein in Caco-2 cells. 10th International ISSX Meeting. 2013年9月29日-10月3日. Toronto (Westin Harbour

Castle Hotel).

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

小倉 次郎 (OGURA JIRO)

北海道大学・大学院薬学研究院・助教

研究者番号：20580640

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし