

機関番号：16101

研究種目：若手研究 (A)

研究期間：2007～2010

課題番号：19688007

研究課題名 (和文) ポリフェノール類の機能性と安全性評価のための標的分子の解析

研究課題名 (英文) Study for target molecules of polyphenols to evaluate their functions and safety.

研究代表者

河合 慶親 (KAWAI YOSHICHIKA)

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・助教

研究者番号：50380027

研究成果の概要 (和文)：本研究ではケルセチンやカテキンといった日常摂取する代表的なポリフェノールの生体内標的部位の探索を行うことで、その機能性や安全性に関わる分子機構の解析を試みた。ケルセチン抱合体やエピカテキンガレートを認識する特異的モノクローナル抗体を樹立し、これらがヒト動脈硬化発症に関わるマクロファージに選択的に作用しうることを *in vivo* 及び *in vitro* で示すことに成功した。

研究成果の概要 (英文)：To investigate the molecular mechanism for the functions and safety of polyphenols and to identify their molecular targets, we developed novel monoclonal antibodies that specifically recognize quercetin or epicatechin gallate. Using these antibodies, we have identified macrophage cells in human aorta as the specific target of these polyphenols.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	7,000,000	2,100,000	9,100,000
2008年度	4,500,000	1,350,000	5,850,000
2009年度	3,700,000	1,110,000	4,810,000
2010年度	3,100,000	930,000	4,030,000
年度			
総計	18,300,000	5,490,000	23,790,000

研究分野：食品機能化学

科研費の分科・細目：農芸化学・食品科学

キーワード：ポリフェノール、酸化ストレス、マクロファージ、動脈硬化症、炎症、 $\beta$ グルクロニダーゼ、オートファジー

## 1. 研究開始当初の背景

ポリフェノール類は、食品中に幅広くかつ比較的多く含まれる機能性成分であり、動脈硬化、がん、糖尿病などの生活習慣病からアルツハイマー病などの神経変性疾患に至る種々の疾病に対して予防あるいは改善効果が期待されてきた。ポリフェノールの代表的な機能は酸素ラジカルの捕捉作用による抗酸化性であるが、近年ポリフェノール類が

細胞内のシグナル伝達経路を刺激し、遺伝子発現制御を介して生体防御に関与することも支持されている。一方、抗酸化性という化学反応性を有したポリフェノールはいわば“両刃の剣”であり、ある条件下では酸化反応を促進する“プロオキシダント”としての事例も報告されており、食品としてのポリフェノールの安全性評価も重要な課題である。茶カテキン受容体が見出されるなど、

近年その作用機構の一端が明らかになりつつあるものの、ポリフェノール類が実際生体内でどのような挙動を示し、どのような分子機構で機能性を発揮するのかのダイナミクス、あるいはプロオキシダントとしての不利益な作用を起こす生体内条件については不明であった。

## 2. 研究の目的

ポリフェノールの生体内における特異的な標的部位・標的分子については検討がなされておらず、これは、生体内からのポリフェノール類の検出法が高速液体クロマトグラフィー (HPLC) などの化学分析に限られており、生体サンプル中の総和として評価するしか手段がないのが大きな要因であった。そこで、本研究では、ポリフェノールやその代謝物を検出する新規プローブとしての抗体開発とその応用手法を構築し、食品として摂取したポリフェノール類の体内動態および生体内標的部位・標的分子を解析することにより、その機能性発現機構と安全性を評価する基礎的情報を得ることを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) 抗ポリフェノール新規モノクローナル抗体の作製

機能性ポリフェノールとしてケルセチン(フラボノール類)、エピガロカテキン(茶カテキン)、シアニジン(アントシアニン類)、ダイゼイン(イソフラボン類)を設定し、これらを免疫抗原とするべくタンパク質(keyhole limpet hemocyanin (KLH) あるいはウシ血清アルブミン (BSA) など) に化学的に結合させ免疫抗原を調製した。モノクローナル抗体は、Balb/c マウスへの繰り返し免疫後、ELISA 法による抗体価の確認を経て、ポリエチレングリコール法によりハイブリドーマの調製を行い、スクリーニングとクローニングを経て最終的に単クローンを取得した。得られた抗体は、競合 ELISA 法により特異性の解析を行い、当該ポリフェノール及び他のポリフェノールへの交差性を検討した。

### (2) 抗ポリフェノール抗体の免疫組織染色への応用と標的部位の解析

作製した抗ポリフェノール抗体についてヒトおよびラット(あるいはマウス)を対象として免疫組織染色への応用を試みた。

### (3) ポリフェノールの標的分子から見た機能性と安全性の評価

各種ポリフェノールの標的分子候補について、培養細胞を用いて解析を試みた。ポリフェノールを処理した培養細胞においてタンパク質・遺伝子の発現量をイムノブロットあるいは RT-PCR 法により解析を行った。また、特異的阻害剤や遺伝子の過剰発現、

siRNA によるノックダウンを用いることで、標的分子の同定と作用機構の解析を行った。

## 4. 研究成果

食品中に幅広く含まれるポリフェノールであるケルセチンの抗動脈硬化作用機構に着目し、その生体内動態と作用機構との関係を明らかにすることを目的とし、ケルセチンのヒト血中主要代謝物であるケルセチン 3 グルクロン酸抱合体 (Q3GA) を認識する特異モノクローナル抗体を用いた免疫組織化学的検出法を確立した。本法をヒト大動脈組織切片へ応用することにより、Q3GA がヒト動脈硬化病巣において泡沫化マクロファージに特異的に存在する事実を見出した。これにより、これまで生体内において不明であった食品ポリフェノールの標的部位の一つが活性化マクロファージであることが示唆された。そこで、Q3GA による抗動脈硬化作用を明らかにするため、培養マクロファージ細胞 RAW264 を用いた検討を試みたところ、Q3GA は動脈硬化病巣形成に必須な分子であるマクロファージスカベンジャー受容体の一つ (SR-A) の遺伝子発現を顕著に抑制することが明らかとなった。さらに、Q3GA によるこの抑制作用には  $\beta$  グルクロニダーゼやメチル化酵素 COMT などマクロファージに特徴的な酵素活性による Q3GA の活性化が必要であることが示された。よって、元来外来異物として解毒代謝・不活性化されると考えられてきたポリフェノールが生体内でその活性を発揮するための新たな分子機構が示唆された。

次に、カテキンにも着目し同様の検討を進めた結果、エピカテキンガラート (ECg) を認識するモノクローナル抗体を樹立するに至り、ヒト動脈硬化病巣の免疫染色により、ECg はケルセチン抱合体同様マクロファージに特異的に蓄積することが明らかとなった。よってマクロファージは少なくともケルセチンおよびカテキンの共通の標的細胞となりうることが示唆された。

そこで培養マクロファージ細胞を用いてポリフェノールの抗動脈硬化作用機構の検討を行ったところ、ケルセチン抱合体および ECg いずれもマクロファージ細胞に顕著に蓄積し、動脈硬化促進的に働くスカベンジャー受容体 (SR-A や CD36) や酸化酵素ミエロペルオキシダーゼの発現と活性をそれぞれ阻害することが明らかとなった。このように、食品ポリフェノールは標的細胞であるマクロファージに対して特異的に作用し抗動脈硬化作用を発揮することが示唆された。

最後に、ポリフェノールの生体内での機能性と安全性に関わる選択的作用機構について検討を進めた。マクロファージ細胞 RAW264 を用いて脱抱合酵素を探索したところ、 $\beta$  グルクロニダーゼが分泌されているこ

とが同定された。βグルクロニダーゼ発現量についてマウス各組織間で比較したところ、本酵素はマクロファージにおいて最も顕著に発現していることが示された。さらに、その分泌量はマクロファージの炎症状態と密接に関与しており、各種阻害剤を用いた検討から、カルシウムイオンやMAPキナーゼ経路が重要な役割を担っていることが示唆された。一方、マクロファージの活性化・炎症反応にオートファジーが関与することが最近報告されたことから、ポリフェノールによるオートファジーへの影響を検討したところ、ケルセチンをはじめとするフラボノイド類に顕著なオートファジー活性化作用が認められた。さらに、ケルセチンはRAW264からのβグルクロニダーゼの分泌を顕著に抑制した。よって、ケルセチン代謝物は活性化マクロファージによって脱抱合され、オートファジー誘導を介した抗炎症作用を示し、炎症を鎮静化させることが示唆された。以上の結果より、ケルセチンをはじめとするポリフェノールは代謝物として安全に生体内を循環し排出される一方、炎症部位においてはマクロファージによって選択的に活性化され、抗炎症作用を介して抗動脈硬化作用を発揮することが示された。

#### 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 11 件)

- ① Kawai, Y., Saito, S., Nishikawa, T., Ishisaka, A., Murota, K., and Terao, J. Different profiles of quercetin metabolites in rat plasma: comparison of two administration methods. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 査読有、73, 517-523 (2009).
- ② Kawai, Y., Tanaka, H., Murota, K., Naito, M., and Terao J. (-)-Epicatechin gallate accumulates in foamy macrophages in human atherosclerotic aorta: implication in the anti-atherosclerotic actions of tea catechins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 査読有、374, 527-532 (2008).
- ③ Shiba, Y., Kinoshita, T., Chuman, H., Taketani, Y., Takeda, E., Kato, Y.,

Naito, M., Kawabata, K., Ishisaka, A., Terao, J., and Kawai, Y. Flavonoids as substrates and inhibitors of myeloperoxidase: molecular actions of aglycone and metabolites. *Chem. Res. Toxicol.* 査読有、21, 1600-1609 (2008).

- ④ Kawai, Y., Nishikawa, T., Shiba, Y., Saito, S., Murota, K., Shibata, N., Kobayashi, M., Kanayama, M., Uchida, K., and Terao, J. Macrophage as a target of quercetin glucuronides in human atherosclerotic arteries: implication in the anti-atherosclerotic mechanism of dietary flavonoids. *J. Biol. Chem.* 査読有、283, 9424-9434 (2008).
- ⑤ Kawai, Y., Matsui, Y., Kondo, H., Morinaga, H., Uchida, K., Miyoshi, N., Nakamura, Y., and Osawa, T. Galloylated catechins as potent inhibitors of hypochlorous acid-induced DNA damage. *Chem. Res. Toxicol.* 査読有、21, 1407-1414 (2008).
- ⑥ Kawai, Y., Ishisaka, A., Saito, S., Uchida, K., Shibata, N., Kobayashi, M., Fukuchi, Y., Naito, M., and Terao, J. Immunochemical detection of flavonoid glycosides: development, specificity, and application of novel monoclonal antibodies. *Arch. Biochem. Biophys.* 査読有、476, 124-132 (2008)

[学会発表] (計 6 件)

- ① 河合慶親「炎症部位における食品由来ポリフェノールの選択的作用機構」第 27 回臨床フリーラジカル会議 (亀岡) 20

10. 12. 3

- ② 河合慶親「抗酸化食品因子の生体内標的部位と酸化ストレス制御機構に関する研究」日本農芸化学会中四国支部第26回講演会（松山）2010. 1. 23
- ③ 河合慶親「機能性ポリフェノールの標的部位と作用機構：抗ポリフェノール抗体の開発から見えてきたこと」日本農芸化学会2009年度大会（福岡）2009. 3. 28
- ④ 河合慶親「脱抱合を介したケルセチン抱合体の活性発現機構」日本農芸化学会（名古屋）2008. 3. 27
- ⑤ Yoshichika Kawai 「Immunochemical characterization of dietary flavonoid metabolites in aorta: Implication in the anti-atherosclerosis effect」3rd International Conference on Polyphenols and Health (ICPH) シンポジウム講演、2007. 11. 26
- ⑥ 河合慶親「ポリフェノールによる抗動脈硬化作用機構の新展開」日本栄養・食糧学会中四国支部大会（広島）シンポジウム講演、2007. 11. 17

〔図書〕（計2件）

- ① Junji Terao, Kaeko Murota, and Yoshichika Kawai, WILEY-BLACKWELL、Anti-atherosclerotic Effects of Dietary Flavonoids: Insight into their Molecular Action Mechanism at the Target Site、Recent Advances in Polyphenol Research、2010、299-318
- ② 河合慶親、寺尾純二、学会出版センター化学と生物（社団法人日本農芸化学会）、ケルセチンの生体内標的部位と作用機構：抗ポリフェノール抗体の開発と応用から見えてきたものとは？2009、746-747

〔産業財産権〕

○出願状況（計0件）

○取得状況（計0件）

6. 研究組織

(1) 研究代表者

河合 慶親 (KAWAI YOSHICHIKA)

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・助教

研究者番号：50380027