

平成 21 年 4 月 25 日現在

研究種目：若手研究（B）  
 研究期間：2007 年度 ～ 2008 年度  
 課題番号：19700592  
 研究課題名（和文） 細胞傷害性オゾンによる炎症・細胞死誘発活性と食品成分による抑制機構  
 研究課題名（英文） Inhibitory effect of food factors on cytotoxic ozone-induced inflammation and cell death  
 研究代表者 三好 規之 (MIYOSHI NORIYUKI)  
 静岡県立大学 食品栄養科学部 助教  
 研究者番号 70438191

## 研究成果の概要：

本研究では、動脈硬化病巣やアルツハイマー脳患者から検出されたオゾン酸化コレステロール（atheronal-A および B）の生物化学的解析を行い、atheronals が有する強力な細胞毒性活性を明らかにした。また培養細胞、試験管内反応より atheronals 生成分子機構における食品成分の抑制効果について検討を行った。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2100000	0	2100000
2008 年度	1200000	360000	1560000
年度			
年度			
年度			
総計	3300000	360000	3660000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：食生活学

キーワード：健康と食生活、生活習慣病

## 1. 研究開始当初の背景

オゾンは、工業・商業的には細菌・ウイルスの不活化・脱臭・脱色・有機物の除去などに用いられる強力な酸化作用を有する分子で、生体に対しては肺や気管支などの呼吸器官に有害な大気汚染物質としても知られている。2003 年 Wentworth らのグループは、生体内での内因的なオゾン産生の可能性を示し、オゾンによる生体（成分）への影響について注目を集めた。しかし、のちに生体内でのオゾン産生に対して否定的な論文がいく

つか報告され、内因的オゾン産生の真偽については未だに明らかにされていない。

一方、Wentworth らの報告の中で内因的オゾン産生の根拠として検出されたオゾン酸化コレステロール[3 $\beta$ -hydroxy-5-oxo-5,6-secocolestane-6-al (atheronal-A) と、それがアルドール反応で転換した 3 $\beta$ -hydroxy-5 $\beta$ -hydroxy-B-nor-cholestane-6 $\beta$ -carboxaldehyde (atheronal-B)]は、生体成分との反応性や細胞毒性がいくつか報告されており、その生理活性探索や、分子機構解析が求められていた。

## 2. 研究の目的

近年、強力な活性酸素種のひとつであるオゾン (O<sub>3</sub>) が生体内で生成されることが報告され、動脈硬化病巣やアルツハイマー脳でオゾン酸化コレステロールが検出されたことから、動脈硬化や神経変性疾患、さらには呼吸器系疾患など過剰な酸化ストレスにより誘発される種々の疾病への関与が注目されている。しかし強力な酸化力を持つがゆえに不安定な活性酸素種であるオゾンによる酸化的ダメージ及び細胞死誘導機構に関しては、細菌や植物での報告はあるが、ヒトにおいては呼吸器系培養細胞を用いた検討を除き十分明らかにされていない。本研究では、生体内で最も豊富に存在する中性脂質であるコレステロールのオゾン酸化物に注目し、化学的、生物学的解析を行うことを目的とした。

## 3. 研究の方法

Atheronal-A および B は Wentworth らの方法に従って調整した。細胞毒性解析は AlamarBlue (Alamar BioScience, Sacramento, CA) を用い、プロトコールに従い解析した。培地および反応液からの atheronal の回収には、クロロホルム：メタノール (2:1) を用いた。Atheronal は、1mg *p*-トルエンスルホン酸、500 µg 5-dimethylaminonaphthalene-1-sulfonylhydrazine (DNSL)を含むアセトニトリル (5 ml) に溶解し4時間遮光撹拌により DNSL-atheronal 誘導体を調整し、LC-MS/MS を用い定量解析を行った。カラムは TSK-GEL ODS-100V (150×2.1 mm, TOSOH)、HPLC は SHISEIDO

NANOSPACE SI-2、MS は Applied Biosystems API2000 を用いて ESI のポジティブモードにより分析した。HPLC および MS 条件は A 液：アセトニトリル+0.1%ギ酸、B 液：水+0.1%ギ酸によるグラジェント方式で0分で A 液 30%-B 液 70%、20分で A 液 100%-B 液 0%、50分で A 液 100%-B 液 0%、60分で A 液 30%-B 液 70%、80分で A 液 30%-B 液 70% で、secosterol-A (m/z 667.238/170.3, 171.3)、secosterol-B (m/z 667.238/170.2, 171.1)をモニターする MRM モードで解析した。

## 4. 研究成果

動脈硬化プラークやアルツハイマー脳など炎症関連疾患の組織中から見出された atheronals の疾患への関与を明らかにする目的で、まず atheronals-A および B の有する細胞毒性活性を検討した。ヒト骨髄性急性白血病由来 HL-60 細胞を様々な濃度の atheronal-A および B へ24時間暴露すると、atheronal-A および B は濃度依存的な細胞毒性活性を示した (IC<sub>50</sub> = 10 µM)。この細胞毒性活性は、毒性を有する他の酸化コレステロール (7-ketocholesterol、25-hydroxycholesterol、27-hydroxycholesterol、7β-hydroxycholesterol、5,6-epoxycholesterol) と比べ4~10倍強い細胞毒性を示した。Atheronal-A および B は24時間以降も72時間まで時間依存的な細胞毒性を示し、48および72時間後の IC<sub>50</sub> は0.7および<0.5 µMであった。7-ketocholesterol、25-hydroxycholesterol、27-hydroxycholesterol、7β-hydroxycholesterol、5,6-epoxycholesterol には24時間以降の暴露時間依存的な細胞毒性は認められなかった。また、atheronal-A、-B によって誘導された細胞死は DNA の断片化、核凝集、カスパーゼの活性化を伴うアポトーシスであった。

さらに、本研究では、生体内における atheronal 生成の詳細な分子メカニズム解析を行い、コレステロールと myeloperoxidase (MPO)、およびその基質である H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> と Cl<sup>-</sup> の存在下での試験管内反応より、atheronal-A および B が生成することを明らかとした。また、これらの atheronal 生成は、methionine やβ-carotene など一重項酸素スカベンジャーとにより有意に抑制されたことから、MPO 活性化による atheronals 生成メカニズムにおける一重項酸素の関与を強く示唆する結果を得た。

また、研究代表者らの研究グループは既に、好中球様分化 HL-60 細胞を PMA で活性化させると atheronal-A および B が生成することを確認している。そこで、実験系を用い、atheronal 生成系における食品由来成分 (Vitamin C および E など) の効果について検討した。その結果、α-tocopherol およびγ-tocotrienol には atheronal 生成抑制効果は認められなかった。一方、ascorbic acid は PMA 暴露により誘導される atheronal 生成を有意に促進した(約3倍)。今後 ascorbic acid が促進する atheronal 生成メ

カニズムの詳細な解析が必要である。

#### 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)

1. Tomono S, Miyoshi N, Sato K, Ohba Y, Ohshima H.  
Formation of cholesterol ozonolysis products through an ozone-free mechanism mediated by the myeloperoxidase-H(2)O(2)-chloride system. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (2009) *in press*
2. Miyoshi N, Watanabe E, Osawa T, Okuhira M, Murata Y, Ohshima H, Nakamura Y.  
ATP depletion alters the mode of cell death induced by benzyl isothiocyanate. *Biochim. Biophys. Acta.* (2008) 1782, 566-573

[学会発表] (計 10 件)

1. 伴野 勸、塩川秀美、三好規之、望月和樹、合田敏尚、大島寛史、活性化好中球が産生するオゾン様活性酸素による酸化コレステロールの生成、第81回日本生化学会大会、2008.12.9-12. 神戸
2. 馬淵良太、栗田亜矢、三好規之、菅 敏幸、雨谷敬史、大島寛史、アセトアルデヒド曝露マーカーとしてのタンパク質中のN<sup>ε</sup>-エチルリジンのNCI-GC/MSによる分析：ヒト口腔内剥離細胞における検出、日本環境変異原学会第37回大会、2008.12.4-6. 沖縄
3. 頼 盈伶、青山沙絵、永井竜児、三好規之、大島寛史、AGEs由来アルギニン誘導体によるアルギニン代謝に関与する酵素活性に及ぼす影響、第18回日本メイラード学会、2008.11.28-29. 東京
4. Lai Y-L, Aoyama S, Nagai R, Miyoshi N, Ohshima H. Inhibitory effects of advanced

glycation end products-related arginine derivatives on enzymatic activities of arginine-metabolizing enzymes. The International Symposium on Lipid Peroxidation 2008. 2008.10.15-17. Karuizawa, Nagano, Japan.

5. Tomono S, Miyoshi N, Ohshima H.  
Cytotoxic effects of cholesterol ozonolysis products on HL-60 cells. The International Symposium on Lipid Peroxidation 2008. 2008.10.15-17. Karuizawa, Nagano, Japan.
6. Tomono S, Shiokawa H, Miyoshi N, Ohshima H. Foemation of cholesterol ozonolysis products by differentiated neutrophil-like HL-60 cells activated with phorbol myristate acetate. The International Symposium on Lipid Peroxidation 2008. 2008.10.15-17. Karuizawa, Nagano, Japan.
7. Aoyama S, Lai Y-L, Miyoshi N, Ohshima H.  
Increased expression and enzymatic activities of dimethylarginine dimethylaminohydorrase in cultured human cancerous and non-cancerous cells. Fifth International Conference Biology, Chemistry and Therapeutic Applications of Nitric Oxide. 2008.8.24-28. Bregenz, Austria.
8. Lai Y-L, Aoyama S, Nagai R, Miyoshi N, Ohshima, H. Inhibitory effects of advanced glycation end products-related arginine derivatives on enzymatic activities of three isoforms of nitric oxide synthase. Fifth International Conference Biology, Chemistry and Therapeutic Applications of Nitric Oxide. 2008.8.24-28. Bregenz, Austria.
9. 伴野 勸、三好規之、石井剛志、大島寛史、好中球様分化HL-60細胞におけるオゾン酸化コレステロールの生成、第61回日本酸化ストレス学会学術集会、2008.8.24-28. 京都

10. Miyoshi N, Nakamura Y, Ohshima H.  
Alpha-tocopherol induces procaspase-3  
expression mediated by the transcriptional  
factor Sp1.  
Experimental Biology, 2008.4.5-9. San  
Diego, CA, USA.

〔図書〕 (計 2 件)

1. Ohshima H, Tomono S, Lai Y-L, Miyoshi N  
(分担) “Inflammation-Induced  
Carcinogenesis and Chemoprevention”  
Chemoprevention of Cancer and DNA  
Damage by Dietary Factors  
(WILEY-BLACKWELL) (2009) 145-152
2. 大島寛史、三好規之 (分担) “がん予防  
と酸化ストレス”、がん予防『酸化スト  
レスの医学』 (診断と治療社)  
(2008)329-337.

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

なし

○取得状況 (計 0 件)

なし

〔その他〕

なし

## 6. 研究組織

(1)研究代表者

三好規之 (MIYOSHI NORIYUKI)

静岡県立大学 食品栄養科学部 助教

研究者番号 70438191

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし